Rapporti ISTISAN

10/32 Rev.

3° Congresso nazionale

Le micotossine nella filiera agro-alimentare e zootecnica

ISSN 1123-3117

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 28-30 settembre 2009

ATTI a cura di
C. Brera, E. Gregori,
B. De Santis e M. Miraglia

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

3° Congresso nazionale

Le micotossine nella filiera agro-alimentare e zootecnica

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 28-30 settembre 2009

ATTI

A cura di
Carlo Brera, Emanuela Gregori,
Barbara De Santis e Marina Miraglia

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN
10/32 Rev.

Istituto Superiore di Sanità
3° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare e zootecnica. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 28-30 settembre 2009. Atti.
A cura di Carlo Brera, Emanuela Gregori, Barbara De Santis e Marina Miraglia
2010, v, 251 p. Rapporti ISTISAN 10/32 Rev.

Il Congresso si propone di evidenziare sia i principali aspetti correlati alle ricadute di carattere sanitario, agronomico, industriale e diagnostico derivanti dalla contaminazione da micotossine nei prodotti della filiera agro-alimentare, sia i principali risultati ottenuti in ambito scientifico derivanti dai progetti di ricerca nazionali e transnazionali. L'evento si rivolge pertanto a tutti i ricercatori e agli operatori del sistema alimentare e mangimistico, con l'auspicio di fornire, attraverso le proprie esperienze e i propri contributi relativi allo svolgimento delle attività operative e gestionali, uno scenario quanto più rappresentativo del problema delle micotossine nel nostro Paese. Ciò al fine di valutare le attività correttive da effettuarsi in via preventiva per limitare l'impatto sanitario di questi contaminanti sulle produzioni, sugli animali e infine sulla salute pubblica. Infine, gli argomenti trattati in questo Congresso saranno orientati sia alla diffusione di informazioni scientifiche in grado di tutelare il consumatore italiano, sia alla individuazione di eventuali e urgenti necessità di informazioni ancora mancanti da acquisire nell'ambito dei futuri progetti di ricerca, sia infine all'acquisizione degli strumenti operativi in grado di garantire una maggiore competitività sul mercato europeo e internazionale.

Parole chiave: Micotossine, Analisi del rischio, Progetti di ricerca, Alimenti

Istituto Superiore di Sanità
3th National Congress. Mycotoxins in agri-food chain. Istituto Superiore di Sanità. Rome, September 28-30, 2009. Proceedings.
Edited by di Carlo Brera, Emanuela Gregori, Barbara De Santis and Marina Miraglia
2010, v, 251 p. Rapporti ISTISAN 10/32 Rev. (in Italian)

The Congress is aimed at focusing on the main aspects related to the different outputs derived from sanitary, agronomic, industrial and diagnostic implication regarding mycotoxin contamination in agri-food chain products and from the existing research projects promoted at national and transnational level. Therefore, this event is addressed to all the researcher and stakeholders of the food and feed chain, with the auspices that, through their own experiences and contributions, exhaustive information on operating and managerial activities to be implemented to control as much as possible mycotoxin contamination in food and feed products is achieved. This approach would contribute to limit the sanitary impact of these xenobiotics on human and animal health and the negative consequences for the food and feed system. Finally, the topics addressed at this Congress can help the dissemination of scientific information related to safeguarding the Italian consumer to the exposure of such toxic substances, the individuation of emerging needs to be included in the ongoing research projects and to achieve better competitiveness in the European and international markets.

Key words: Mycotoxins, Risk analysis, Research projects, Foodstuffs

Si ringrazia Maria Antonietta Alessandrini per il lavoro di organizzazione del congresso.
Si ringrazia Maria Cristina Barea Toscan per l'aiuto nella redazione del documento.

Per informazioni su questo documento scrivere a: carlo.brera@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Questo rapporto contiene un contributo in più (pag. 247-251) rispetto al precedente Rapporto ISTISAN 10/32.

Citare questo documento come segue:
Brera C, Gregori E, De Santis B, Miraglia M (Ed.). *3° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare e zootecnica. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 28-30 settembre 2009. Atti.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2010. (Rapporti ISTISAN 10/32 Rev.).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione*: Paola De Castro, Sara Modigliani* e *Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

INDICE

SECONDA SESSIONE

Gestione del rischio da micotossine

TERZA SESSIONE
Diagnostica delle micotossine

PREMESSA

La terza edizione del Congresso Nazionale sulle micotossine nella filiera agro-alimentare ha avuto, al pari delle precedenti un largo consenso da parte dei partecipanti, sia per quanto riguarda la numerosità degli intervenuti sia per i lusinghieri commenti da parte degli stessi. Di questo siamo particolarmente soddisfatti in quanto il successo mostrato è per noi di fondamentale importanza per continuare a rispondere alle necessità e alle esigenze sia della Autorità Competente, che del comparto ricerca e degli operatori interessati al settore delle micotossine a livello nazionale.

Questa edizione è stata caratterizzata da alcuni aspetti innovativi, con particolare riguardo alla presentazione delle più strutturate e più significative ricerche nazionali e internazionali riguardanti i temi classici sia della valutazione e gestione del rischio che della diagnostica.

I risultati presentati dai relatori hanno pertanto fornito una utilissima visione d'insieme sulla ricerca fin qui dedicata alla "situazione micotossine" in Italia, indispensabile punto di partenza per l'avvio di progetti di ricerca innovativi, armonizzati e di maggiore fruibilità per il settore produttivo, al fine di meglio proteggere la salute del consumatore e la qualità del prodotto nazionale.

Più specificatamente è stata effettuata una disamina critica della distribuzione della progettualità, evidenziando una sproporzione alquanto evidente fra le risorse investite nella diagnostica rispetto ad altri temi di ricerca, incluso il campionamento. Particolarmente puntuali sono stati gli interventi delle Autorità governative che hanno illustrato e prospettato il loro rilevante impegno su questo delicato tema di salute pubblica.

È d'obbligo pertanto formularvi un sincero ringraziamento per l'interesse mostrato nel partecipare con competenza, collaborazione ed entusiasmo ai lavori del Congresso.

Nell'augurare a tutti voi un sincero "buon lavoro" vi invitiamo alla quarta edizione che si terrà nel 2011.

I temi che caratterizzeranno la quarta edizione riguarderanno in particolar modo le realtà produttive di tutto il comparto agricolo ed alimentare. Sarà obiettivo del IV Congresso presentare le attività di ricerca e di controllo messe in atto sia dalle aziende medio-piccole sia dai grandi gruppi industriali per fornire un quadro quanto più completo di come i settori della produzione, della trasformazione e della distribuzione, affrontano il problema delle micotossine a tutela della salute del consumatore e del benessere degli animali.

PRIMA SESSIONE
Valutazione del rischio da micotossine

LIVELLI DI OCRATOSSINA A NEL SIERO DI UN CAMPIONE DI POPOLAZIONE MOLISANA

Amedeo Pietri (a), Terenzio Bertuzzi (a), Filippo Rossi (a), Gianfranco Piva (a), Silvia Rastelli (a), Annalisa Mulazzi (a), Romina di Giuseppe (b), Licia Iacoviello (b)
(a) Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore,Piacenza
(b) Centro di Ricerca Giovanni Paolo II, Università Cattolica del Sacro Cuore, Campobasso

Introduzione

L'Ocratossina A (OTA), prodotta principalmente da *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*, può essere presente in numerosi alimenti della nostra dieta; l'esposizione dell'uomo all'OTA può verificarsi attraverso il consumo di alimenti sia di origine vegetale (cereali e derivati, frutta secca, caffè, cacao, spezie, vino), che animale (carne suina e derivati). L'OTA ha evidenziato una potente attività immunodepressiva e nefrotossica, ed è stata classificata dallo IARC (*International Agency for Research on Cancer*) nel gruppo 2B, come sostanza potenzialmente cancerogena per l'uomo. L'escrezione della tossina dall'organismo umano risulta particolarmente lenta; studi hanno indicato un tempo di emivita di OTA nel sangue di 35,5 giorni, dovuto al riassorbimento della tossina durante la circolazione enteroepatica, al riassorbimento che avviene nel rene dopo la secrezione tubulare e al forte legame con le proteine plasmatiche, in particolar modo con l'albumina. L'escrezione renale sembra essere il principale meccanismo d'eliminazione; tuttavia studi realizzati su campioni di latte umano prelevato da donne di diversi paesi europei, hanno evidenziato come l'eliminazione dell'OTA avvenga, anche se in piccola quantità, anche attraverso questa via. In Italia, ad esempio, è stata rilevata una elevata presenza di OTA sia nel siero (100% di positività), che nel latte materno (circa 80%) (1,2). Per la sua prolungata persistenza nell'organismo e per la diffusione in diversi tipi di alimenti, la determinazione dell'OTA nel sangue rappresenta un parametro di valutazione del livello di esposizione per ogni individuo o per una determinata popolazione. Il livello di OTA può essere quindi correlato con alcuni alimenti della dieta e anche essere indicatore di patologie specifiche, soprattutto a carico del parenchima renale.

Materiali e metodi

In collaborazione con l'Università Cattolica di Campobasso, è stata condotta un'indagine sulla popolazione della regione Molise. Sono stati prelevati campioni di siero ematico da 341 individui (154 uomini e 187 donne), di età compresa tra 38 e 48 anni, ai quali è stato chiesto di compilare il questionario sulle abitudini alimentari EPIC, consegnato da personale qualificato. I dati raccolti sono stati elaborati con software NAF (*Analysis of Food Frequency Questionarie*) capace di quantificare in frequenze il questionario. Sono stati quindi determinati il livello di contaminazione da OTA e alcuni parametri ematici, indicatori della funzionalità epatica e renale, con lo scopo di studiare eventuali correlazioni con il comportamento alimentare. In particolare sono stati determinati i livelli di proteina C reattiva, creatinina, urea, aptoglobina, GOT, GGT, GPT.

Analisi di Ocratossina A

In una provetta di vetro, a 2 mL di siero sono stati aggiunti 2 mL di H_2O bidistillata, 0,3 mL di soluzione acquosa di acido tricloroacetico al 15% e 2 mL di cloroformio. La provetta è stata agitata per 60 secondi su vortex e lasciata a temperatura ambiente per 4 ore, agitando ogni 30 minuti, per favorire l'estrazione da parte del cloroformio e per una migliore precipitazione della frazione proteica. Dopo centrifugazione per 5 minuti, è stata prelevata la fase inferiore di cloroformio per trasferirla in una seconda provetta. La partizione con cloroformio è stata ripetuta per altre 2 volte. Il volume raccolto dalle 3 estrazioni è stato ridotto a 2 mL sotto flusso di azoto. Sono state condotte, quindi, 3 estrazioni con 2 mL ciascuna di soluzione 0,13 M di $NaHCO_3$ trasferendo in un'altra provetta la fase acquosa superiore. Questa, addizionata dello stesso volume di PBS (*Phosphate Buffered Saline*) è stata purificata su colonna a immunoaffinità (VICAM). Effettuato un lavaggio con 2 mL di PBS, l'OTA è stata eluita in provetta graduata con 3 mL di CH_3CN. Dopo avere concentrato l'estratto sotto flusso di N_2, è stato portato ad 1 mL con una miscela CH_3CN:H_2O (35+65 v/v), agitando in bagno ad ultrasuoni e su vortex; infine, il campione è stato filtrato (0,45 µm). L'OTA è stata determinata mediante analisi HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*); la separazione è stata effettuata con colonna Luna *Phenyl-Hexyl* (Phenomenex), utilizzando come fase mobile un gradiente CH_3CN: soluzione acquosa al 2% di CH_3COOH (da 35 a 67% di CH_3CN in 9 minuti) a flusso di 1,0 mL/min. La rivelazione è stata effettuata mediante fluorimetro impostato a $\lambda_{eccitazione}$=333 nm e $\lambda_{emissione}$=470 nm.

Analisi ematiche

Le analisi per la determinazione dei parametri ematici sono state effettuate con auto-analizzatore ILAB 600 (Instrumentation Laboratory, MA, USA). La Proteina C reattiva è stata determinata sulla totalità dei campioni, i dati riguardanti gli enzimi epatici e l'aptoglobina si riferiscono invece ad un primo gruppo di 73 campioni. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SAS 9.1.3 per Windows, mentre quelle di correlazione tramite stima dell'indice di correlazione di Pearson. La regressione lineare multivariata aggiustata per età, sesso e *intake* totale di calorie giornaliere (SAS PROC REG) è stata utilizzata per stimare la relazione tra i terzili di consumo dei vari alimenti, trattati come variabili lineari, e le concentrazioni di OTA nel plasma. Ulteriori analisi sono state condotte dividendo l'intera popolazione per sesso. In quest'ultimo caso le analisi sono state aggiustate per età e *intake* totale di calorie.

Risultati e discussione

Sono state valutate le percentuali di recupero del metodo utilizzato per la determinazione dell'OTA, aggiungendo ad aliquote di un campione di siero esente da contaminazione, un volume misurato di una soluzione standard di OTA, in modo da avere una contaminazione pari a 50 e 400 ng/L. La percentuale media di recupero è stata pari a 93,3±3,6%. I limiti di rivelazione (*Limit Of Detection*, LOD) e di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ) sono stati rispettivamente di 0,5 e 1 ng/L. Per quanto riguarda i risultati dell'indagine (Figura 1), solo in 3 campioni non è stata riscontrata OTA (positività = 99,1%); il 62% ha mostrato una concentrazione inferiore a 200 ng/L e solo nel 5,3% dei campioni (n=18) è stata rilevata una concentrazione superiore a 500 ng/L (valore massimo 2918 ng/L). Il valore medio è stato pari a 228±234 ng/L. I dati relativi agli uomini sono risultati statisticamente superiori ($p<0,01$) rispetto a quelli delle donne, con un valore medio rispettivamente di 271±303 ng/L contro 193±147 ng/L.
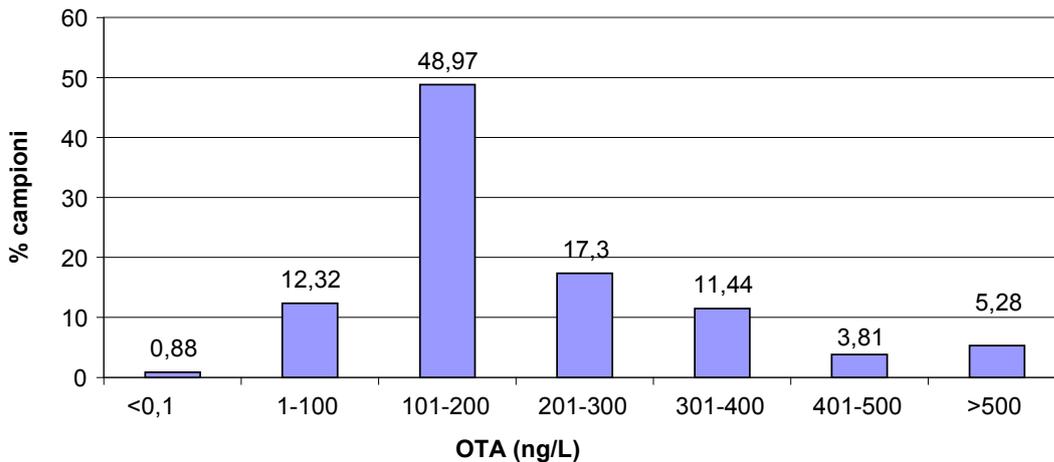
Figura 1. Ripartizione percentuale dei campioni in funzione del livello di OTA nel siero.
Relazione tra comportamento alimentare e OTA

Per evidenziare una correlazione tra il livello ematico di OTA e la dieta, è stato utilizzato un modello multivariato di base, nel quale età e sesso fossero inseriti come fattori confondenti. Le analisi sono state condotte prima sulla totalità dei campioni, poi separatamente su quelli delle donne e degli uomini, correggendo i parametri antropometrici per l'età e le calorie totali.

Considerando il comportamento alimentare in base ai questionari compilati, è stata riscontrata una correlazione positiva tra il livello di OTA ematico e il consumo di pasta, uova, burro e salumi; si è osservata anche una correlazione negativa con il consumo di olive e di frutta, a testimonianza della loro probabile azione antiossidante, favorendo l'escrezione della tossina attraverso le urine. Riferendosi solo ai dati relativi alle donne, è stata invece rilevata una correlazione positiva con il consumo di formaggi stagionati. Nella Tabella 1 sono evidenziati i dati significativi ($p<0,05$) con i relativi coefficienti di regressione lineare ($\beta \pm$ SEM, *Standard Error of Mean*) positivi (correlazione diretta con l'OTA) o negativi (correlazione inversa con OTA), in considerazione del campione globale.

Tabella 1. Coefficienti di regressione lineare (β ± SEM) tra il livello ematico di OTA e il consumo di alcuni alimenti (campione globale: n. =341)

Alimenti	β ± SEM	P
Frutta	-0,097	0,024
Olive	-0,108	0,045
Pasta	0,087	0,040
Salumi	0,107	0,020
Uova	0,089	0,040
Burro	0,093	0,051

OTA e parametri ematici

L'ingestione di OTA è stata correlata con diversi parametri ematici ed è emersa una significativa correlazione con la proteina C reattiva, ad indicare come l'ingestione di OTA determini uno stato infiammatorio nell'organismo.

Ulteriore conferma dell'azione pro-infiammatoria dell'OTA, è data dalla correlazione positiva tra il livello ematico della tossina e quello di una proteina *marker* dell'infiammazione

come l'aptoglobina ($r^2 = 0,44$; $p<0,05$). Tra gli enzimi epatici sono stati osservati significativi aumenti della GPT e della GGT nel quartile di maggior concentrazione dell'OTA rispetto al primo. Se l'aumento della GGT potrebbe essere mediato dalla nota azione epatotossica dell'alcool, l'aumento della GPT potrebbe indicare una tossicità epatica diretta della tossina; da notare che la concentrazione della GPT è risultata di poco superiore al valore fisiologico (45,3 *vs* 43 U/L). Non sono risultate correlazioni tra la tossina e i livelli di urea e creatinina, indicatori della funzionalità renale.

Conclusioni

Dall'indagine è emerso che l'OTA è presente nella quasi totalità dei campioni con un valore medio non trascurabile; alcuni autori hanno dimostrato che a livelli superiori a 500 ng/L possono manifestarsi problemi per la funzionalità epatica e renale (3,4,5). È da verificare l'ipotesi di una possibile tossicità epatica della tossina. Sono state confermate correlazioni con il consumo di cereali e carne suina; il consumo di frutta potrebbe ridurre l'assorbimento o favorire l'eliminazione di OTA.

Bibliografia

1. Breitholtz A, Olsen M, Dahlback A, Hult K. Plasma ochratoxin A levels in three Swedish populations surveyed using an ion-pair HPLC technique. *Food Additives and Contaminants* 1991;8:183-92.
2. Palli D, Miraglia M, Saieva C, Masala G, Cava E, Colatosti M, Corsi AM, Russo A, Brera C. Serum levels of ochratoxin A in healthy adults in Tuscany: Correlation with individual characteristics and between repeat measurements. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 1999; Prev 8:265-9.
3. Hassen W, Abid S, Achour A, Creppy E, Bacha H. Ochratoxin A and β2-microglobulinuria in healthy individuals and in chronic interstitial nephropathy patients in the Centre of Tunisia: a hot spot of Ochratoxin exposure. *Toxicology* 2004;199:185-93.
4. Dinis AM, Lino CM, Pena AS. Ochratoxin A in nephropathic patients from two cities of central zone in Portugal. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007;44 (2):553-7.
5. Grosso F, Said S, Mabrouk I, Fremy JM, Castegnaro M, Jemmali M, Dragacci S. New data on the occurrence of ochratoxin A in Human sera from patiets affected or not by renal diseases in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology* 2003;41:1133-40.

Ringraziamenti

Si ringrazia la Fondazione Romeo ed Enrica Invernizzi, che ha finanziato la ricerca.

VALUTAZIONE *IN VITRO* DELL'ESPOSIZIONE ALLE MICOTOSSINE SULLO STATO OSSIDATIVO DI LINFOCITI DEL BOVINO DA LATTE

Umberto Bernabucci, Loredana Basiricò, Pier Paolo Danieli, Bruno Ronchi
Dipartimento di Produzioni Animali, Università della Tuscia, Viterbo

Introduzione

Le micotossine sono metaboliti secondari prodotti da muffe e rilasciati negli alimenti e nei mangimi. Le micotossine a seguito d'ingestione, contatto e inalazione possono essere causa di numerose manifestazioni a carattere patologico (micotossicosi) sia dell'uomo che degli animali (1). Tra le diverse micotossine oggi note, la Fumonisina B_1 (FB_1), l'Aflatossina B_1 (AFB_1), la Tossina T-2 e il Deossinivalenolo (DON), per la loro ampia diffusione soprattutto come contaminanti dei cereali, sono oggetto di estremo interesse medico e tossicologico (2-4). Tra i diversi effetti che possono seguire l'esposizione a queste molecole, l'immunosoppressione è probabilmente quello che suscita maggiore interesse per i possibili risvolti negativi sulla salute umana e animale (4). In molti animali da laboratorio e d'allevamento, ad esempio, l'esposizione alle Aflatossine induce riduzione della risposta immunitaria umorale e/o cellulo-mediata (5). L'immuno-soppressione negli animali è un effetto noto anche per molte *Fusarium*-tossine come le Fumonisine e i Tricoteceni (es. Tossina T-2, DON e Nivalenolo) (6-8). L'immuno-soppressione è un effetto con implicazioni rilevanti per gli animali da reddito in quanto, per tale via, l'esposizione alle micotossine può predisporli alle infezioni, con importanti cali della performance e un incremento dei rischi di trasmissione all'uomo di patogeni quali *Salmonella* e *Listeria* (9). Attualmente i meccanismi secondo cui le micotossine possono indurre l'immuno-soppressione non sono ancora completamente chiariti; tuttavia, l'induzione dello stress ossidativo appare tra i più plausibili. Infatti, è ben documentato come alcune micotossine possono indurre la sintesi di radicali liberi e/o la riduzione delle difese anti-ossidanti della cellula animale (10). L'effetto citotossico delle micotossine è spesso studiato su modelli biologici *in vivo* o *in vitro* usando, in tal caso, cellule epatiche o renali. Tuttavia i dati della letteratura dimostrano come gli effetti siano molto variabili in base al tipo cellulare *target* probabilmente a causa delle peculiarità del metabolismo dei diversi tipi cellulari (11). Considerando che i linfociti, in qualità di componenti del sistema immunitario, sono bersaglio delle micotossine e posseggono ossidasi a funzione mista in grado di trasformare gli xenobiotici con attivazione di molti processi propri dello stress ossidativo (12), l'obiettivo del presente contributo è stato quello di valutare l'idoneità di colture linfocitarie d'origine bovina, come modello per lo studio del potere ossidante delle tossine fungine AFB_1, T-2, DON e FB_1.

Materiali e metodi

Le popolazioni linfocitarie sono state ottenute da sei vacche di razza Holstein (621 kg ± 24 kg di peso vivo) in buono stato di salute e della stessa età. Campioni di sangue periferico sono stati prelevati dalla giugulare mediante tubi sotto vuoto contenenti sodio-eparina (170 I.U.) (BD

Vacutainer® - Becton, Dickinson & Company, Plymuth, UK) e, fino all'utilizzo, sono stati conservati in refrigeratore alla temperatura di 4°C. Gli elementi cellulari mononucleati (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) sono stati isolati come descritto da Lacetera *et al.* (13) e quindi risospesi (densità 1 x 10^6 cellule/mL) nel *medium* arricchito RPMI-1640 (ECM) (Cambrex Bio Science Verviers, Belgium) contenente 25 mM rispettivamente di Hepes (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico) ed L-glutamina. Le colture sono state allestite in duplicato utilizzando piastre in polistirene da 24 pozzetti (Sarsted INC, Newton, USA). Le cellule sono state incubate in presenza di 4 micotossine a diversa concentrazione: Aflatossina B_1 (AFB_1: 0, 5,0 e 20,0 μg/mL), Tossina T-2 (T2: 0, 2,5 e 10,0 ng/mL), Deossinivalenolo (DON: 0, 1,0 e 5,0 μg/mL) e Fumonisina B_1 (FB_1: 0, 35,0 e 70,0 μg/mL). I range di concentrazione nel *medium* di coltura per le quattro micotossine sono stati scelti sulla base del loro potenziale tossico relativamente alla riduzione della proliferazione linfocitaria *in vitro* del 50% riportata in letteratura (6, 7, 14-17). L'effetto dell'esposizione dei linfociti alle quattro tossine è stato valutato a differenti tempi (2 o 7 giorni) incubando le piastre alla temperatura di 39°C in atmosfera al 95% aria e 5% CO_2. Al termine delle prove, le piastre sono state centrifugate a 300 x g per 20 minuti e a temperatura ambiente. Il surnatante è stato scartato e le cellule raccolte e conservate a –80°C fino all'analisi. La lisi delle cellule è stata ottenuta in PBS (*Phosphate Buffered Saline*=tampone fosfato salino) contenente Triton X-100 allo 0,5% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e fenilmetanosulfonil-fluoruro (1 mM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) per 15 minuti a 4°C. Sul lisato cellulare sono stati determinati il contenuto di metaboliti reattivi all'ossigeno (*Reactive Oxigen Metabolites*, ROM), i tioli totali (SH) e la concentrazione della malondialdeide (MDA). La concentrazione dei ROM intracellulari è stata determinata impiegando un kit commerciale (d-ROMs test, Diacron, Grosseto, Italy) secondo le modalità indicate dal produttore del kit stesso. I valori sono stati espressi in mg/dL di perossido d'idrogeno (18). La concentrazione dei tioli intracellulari è stata determinata mediante kit commerciale (SHp Test, Diacron, Italy) ed espressa in μmol/L (19, 20). In sintesi, dopo precipitazione della frazione proteica con soluzione d'acido *meta*-fosforico (1,67 g di acido *meta*-fosforico, 0,2 g EDTA-sale disodico, 30 g di NaCl in 100 mL d'acqua ASTM Type I) il surnatante è stato separato per filtrazione (Puradisk 25AS 0,2 μm, Whatman plc, Maidstone Kent, UK). Un'aliquota del filtrato (0,5 mL) è stata combinata con 0,5 mL di Na_2HPO_4 (300 mM) e quindi è stato aggiunto l'acido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB). Il DTNB reagisce con i tioli liberi del campione formando un composto colorato leggibile per spettrofotometria a 405 nm. La concentrazione degli SH è stata stimata estrapolando i dati da una curva di taratura ottenuta mediante standard a titolo noto. La presenza di MDA nel lisato è stata rilevata mediante RP-HPLC (*Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography*) dopo derivatizzazione con dinitrofenilidrazina (DNPH) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 25°C (21). L'analisi HPLC è stata condotta con un sistema SpectraSystem (Thermo Separation Product, Riviera Beach, FL, USA) equipaggiato con colonna Ultrasphere ODS, 250 x 4,6 mm I.D., 5 μm (Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA, USA). I campioni e gli standard sono stati iniettati manualmente (100 μL) mediante una valvola a sei vie (Rheodyne, L.P. – Rohnert Park, CA, USA). L'eluizione isocratica (1 mL/min) è stata effettuata a temperatura ambiente usando una fase mobile acetonitrile/acetato d'ammonio 50 mM (45:55). In tali condizioni, il complesso MDA-DNPH ha fatto registrate tempi d'eluizione di circa 8,2 minuti e il picco d'assorbanza è stato determinato a 307 nm mediante DAD (UV6000 Diode Array Detector, Thermo Separation Product, Riviera Beach, FL, USA). La curva di taratura è stata sviluppata come indicato da Fenaille *et al.* (21) al fine di quantificare la MDA nel range 0,0-3,0 nmol/mL (R^2=0,9989). L'integrazione dell'area del picco cromatografico e la stima della concentrazione della MDA sono stati effettuate mediante il software ChromQuest™ 3.0 (ThermoQuest Inc, San Jose, CA, USA). L'RNA (*RiboNucleic Acid*) messaggero per gli enzimi superossido dismutasi (SOD) e

glutatione perissidasi (GSH-Px) è stato isolato omogeneizzando i linfociti in 1 mL di TRI-REAGENT™ (Applied Biosystems, CA, USA). La quantificazione dello mRNA è stata effettuata mediante saggio RPA (*Ribonucleotide Protection Assay*, Ambion, Inc., Austin, TX, USA) come descritto precedentemente da Bernabucci *et al.* (22). Specifiche sonde sono state generate utilizzando cDNA per GSH-Px, SOD e gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) come controllo interno, mediante RT-PCR da RNA di linfociti bovini. I differenti *primers* sono stati disegnati sulla base di sequenze bovine per GSH-Px, SOD e GAPDH pubblicate (Tabella 1).

Tabella 1. Sequenza dei *primer* PCR, posizione nella sequenza codificante (CDS), lunghezza prodotti PCR e numero dell'accessione in GeneBank delle sequenze nucleiche di bovino pubblicate

Gene		Sequenza del *primer* (5' → 3')	CDS	Lunghezza	GeneBank
GSH-Px	for§	AACGCCAAGAACGAGGAGAT	265	336	X13684
	rev¥	GGACAGCAGGGTTTCAATGT	600		
SOD	for	TGGAGACAATACACAAGGCTG	147	234	X54799
	rev	CTGCCCAAGTCATCTGGTTT	380		
GAPDH	for	TCATCCCTGCTTCTACTGGC	581	177	U85042
	rev	CCTGCTTCACCACCTTCTTG	757		

§ *Forward*; ¥ *Reverse*

La reazione di trascrizione inversa è stata effettuata secondo il protocollo del produttore (Superscript™ II, GIBCO-BRL, Life Technologies, USA). Dopo trascrizione tutte le sonde sono state purificate a biotinilate mediante kit BrighstarTM Psoralen-Biotin (Ambion, Inc., Austin, TX, USA). Per la quantificazione, dopo precipitazione, i campioni sono stati caricati su gel di acrilammide e trasferiti elettroforeticamente ad una membrane di nylon caricata positivamente (BrightStar™-Plus, Ambion, Inc., Austin, Texas, USA). Per la quantificazione dell'RNA messaggero per GSH-Px, SOD, quantità note di RNA sintetizzato *in vitro* sono state ibridizzate con un eccesso di sonde anti-senso marcate per la costruzione di curve standard. L'RNA messaggero è stato *cross*-legato alla membrana dopo il trasferimento. La rivelazione non-isotopica delle sonde protette è stata effettuata usando i kit BrightStar™ e BioDetect™ (Ambion, Inc., Austin, TX, USA). Infine, la chemioluminescenza è stata analizzata con un densitometro Kodak EDAS-290 e relativo software ID Image Analysis (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA). I dati ottenuti sono stati trasformati in quantità assolute di mRNA (pg/10µg RNA totale) mediante curve standard. Tutti i dati sono stati analizzati mediante la procedura GLM del SAS® (SAS, 1999). I quantitativi di GSH-Px, e SOD mRNA sono stati sottoposti a log-trasformazione prima dell'analisi statistica. Il modello ha incluso come effetti fissi l'animale, il trattamento (micotossina), il livello d'esposizione, la durata e l'errore residuale. Le differenze sono state considerate significative per $P < 0,05$.

Risultati e discussione

Un significativo incremento del livello dei ROM intracellulari è stato osservato alla più elevata concentrazione di AFB_1 tra quelle testate ($p<0,05$) (Figura 1a) e alla media e alta concentrazione di FB_1 ($p<0,05$), senza effetti significativi dovuti alla durata d'esposizione (Figura 1b). Rispetto ai controlli, l'esposizione alla Tossina T-2 sembra avere esplicato un

debole effetto sulla presenza di ROM per tempi lunghi d'esposizione (7 giorni). Nessun effetto significativo è stato invece osservato a seguito d'esposizione linfocitaria al DON. Il carico cellulare di ROM può aumentare in seguito a diverse condizioni, come ad esempio il metabolismo degli xenobiotici con possibile induzione dello stress ossidativo (23). Diversi autori (10, 24, 25) hanno evidenziato come le micotossine possano essere causa di danno alle membrane cellulari attraverso l'aumento dei tassi di lipo-perossidazione, indicando chiaramente il ruolo importante della produzione di ROM nell'esplicarsi dell'azione citotossica e/o genotossico delle micotossine. I dati ottenuti, sebbene in maniera non univoca per quanto riguarda i Tricoteceni, mostrano come per AFB_1 e FB_1 vi sia una relazione dose-dipendente diretta con la concentrazione dei ROM intracellulari a denotare un forte sbilanciamento tra produzione e neutralizzazione dei ROM da parte del linfocita bovino. Il livello di tioli intracellulari è risultato inferiore rispetto al controllo nelle colture esposte a 20 $\mu gAFB_1/mL$, con effetti più marcati dopo 7 giorni d'incubazione, mentre nel caso dell'esposizione a FB_1 è stato registrato un effetto più evidente nei test d'esposizione a breve termine (2 giorni). L'esposizione ai Tricoteceni T-2 e DON non ha esitato in variazioni significative dei tioli intracellulari ($p>0,05$) rispetto alle colture di controllo.
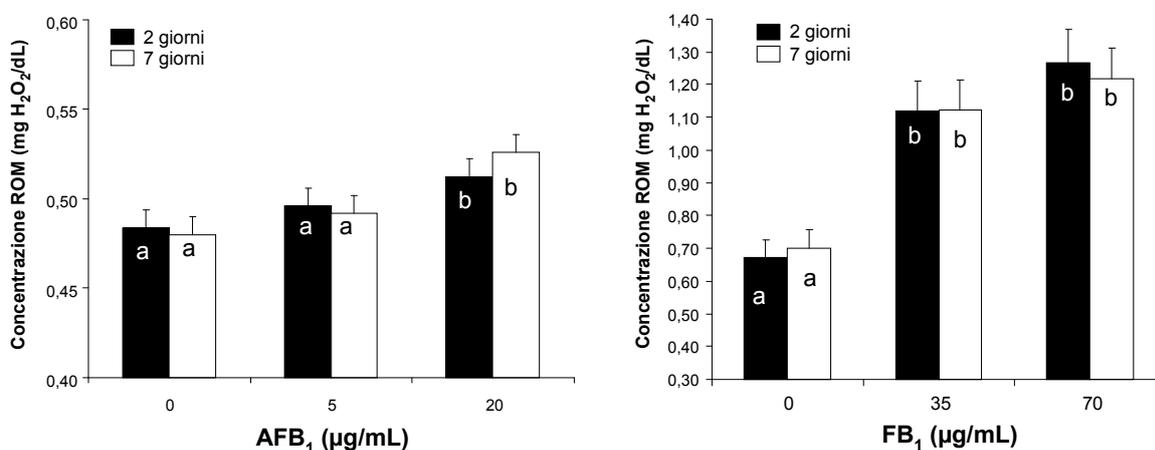
Figura 1. Concentrazione dei ROM in linfociti bovini esposti a differenti livelli di AFB_1 e FB_1 per 2 o 7 giorni *(a e b indicano $p<0,05$ tra livelli d'esposizione per ogni tempo d'incubazione)*

L'inattivazione dei radicali liberi è uno dei meccanismi primari che la cellula animale può mettere in campo per contrastare i danni dovuti a fenomeni ossidativi. Alcune specie chimiche dalla spiccata attitudine anti-ossidante (selenio, Vitamina A, Vitamina C, Vitamina E, coenzima Q_{10}, ecc.) esercitano una certa azione di *scavenging* nei confronti dell'anione superossido ($O_2^{\bullet -}$), considerato un ROM primario (26) proteggendo, pertanto, le membrane cellulari dal danno ossidativo. Altre molecole, tuttavia, come i tioli intracelulari, che rappresentano una buona stima del contenuto cellulare di glutathione (GSH) (27) sono implicate nell'inattivazione dei lipoperossidi ($LOO^{\bullet}$) e degli idroperossidi (LOOH). La comparsa e la gravità della deplezione di GSH sono state proposte come indicatori della formazione di metaboliti tossici della FB_1 (9), del DON e della Tossina T-2 (28). Diversamente da quanto riportato in letteratura, sebbene in condizioni d'esposizione inferiori a quelle da noi testate per vari tipi cellulari quali: cellule renali PK15 di suino (29), neuroblastoma umano SH-SY5Y, glioblastoma di ratto C6 e cellule

ipotalamiche di topo GT1-7 (30), i dati ottenuti nel corso della presente sperimentazione, ad eccezione per l'esposizione all'AFB_1, non mostrano un decremento generalizzato del contenuto intracellulare di tioli. Tale evidenza sembra spiegabile in termini di differenze nel sistema di detossificazione per le diverse micotossine che, nel caso dell'AFB_1, include un passaggio d'epossidazione, idrossilazione di entrambi gli anelli presenti nella molecola (furanico e lattone) e una de-metilazione ossidativa con conseguente genesi di alcuni metaboliti polari. Attraverso l'azione della glutatione-*S*-trasferasi (GST), tali metaboliti sono prevalentemente coniugati con il GSH per essere successivamente escreti (31). Pertanto, l'esposizione ad AFB_1 dei linfociti richiede ampie quantità di GSH che viene consumato nelle reazioni enzimatiche di coniugazione (32). Per quanto riguarda la produzione di MDA, questa è risultata essere incrementata in maniera dose-dipendente dall'esposizione ad AFB_1 sia a due che a sette giorni d'incubazione. Simili risultati sono stati ottenuti a seguito d'esposizione alla FB_1, particolarmente a 2 giorni d'incubazione. Anche per la Tossina T-2, è stato registrato un incremento significativo di MDA intracellulare (Figura 2a) sebbene limitatamente alla più alta concentrazione testata (10 ng/mL) e soprattutto per tempi lunghi d'esposizione (7 giorni) ($p<0,01$).
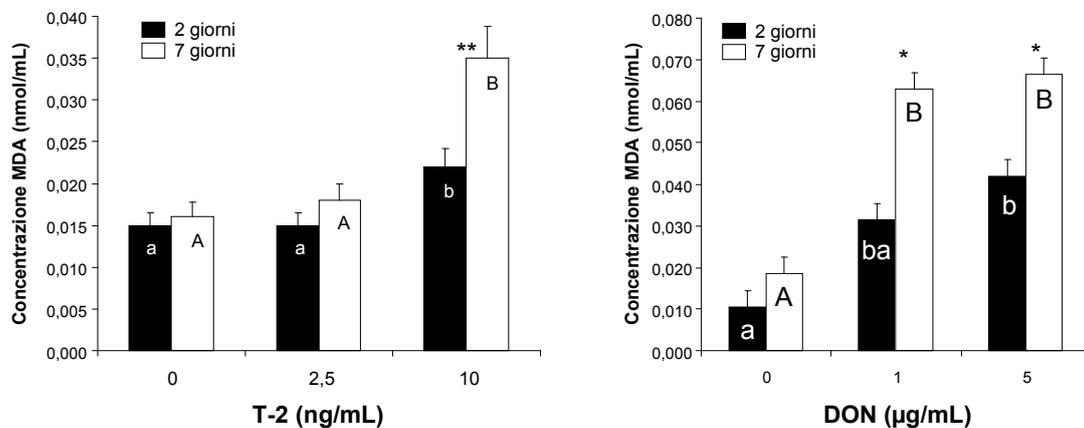
Figura 2. Concentrazione della MDA in linfociti bovini esposti per 2 o 7 giorni a differenti livelli di T-2 e DON ***(a eb indicano p<0,05 tra livelli d'esposizione per ogni tempo d'incubazione; mentre A e B p<0,01 tra livelli d'esposizione per ogni tempo d'incubazione; * p<0,05, tra tempi d'incubazione entro ogni livello d'esposizione; ** p<0,01, tra tempi d'incubazione entro ogni livello d'esposizione)***

Sempre per i saggi a 7 giorni, l'esposizione dei linfociti al DON, per tutte le concentrazioni testate (1 µg/mL e 5 µg/mL), ha fatto registrare incrementi altamente significativi di MDA ($p<0,01$) rispetto ai controlli (Figura 2b). La MDA è un prodotto terminale dei processi cellulari di lipoperossidazione e come tale è considerato un *bio-marker* tardivo del danno cellulare (33). Alla MDA è riconosciuto un ruolo importante nel determinare l'alterazione della fluidità (34) e la fragilità delle membrane cellulari che sovente accompagnano la morte cellulare (35). Inoltre, la MDA è in grado di inibire la funzionalità di vari enzimi e di esercitare un forte effetto inibitorio nella sintesi degli acidi nucleici e delle proteine (36). Attraverso l'interazione MDA-DNA, si forma un addotto che è ritenuto avere un ruolo nei processi di cancerogenesi (37). Wang & Liehr (38) fornirono evidenze circa l'esistenza di tale addotto nei linfociti e in cellule della ghiandola mammaria. Nel caso delle micotossine, Baudrimont *et al.* (39) hanno dimostrato essere presente una relazione diretta per cellule animali (cellule Vero) tra livello d'esposizione *in vitro*

all'Ocratossina A e il contenuto di MDA come indicatore di lipoperossidazione. Stockmann-Juvala *et al.* (30), inoltre, osservarono un incremento concomitante di MDA e GSH in tre linee cellulari di roditori e umane esposte a FB_1. La distruzione della struttura di membrana, l'aumento di endocitosi e della permeabilità di membrana causate dalla FB_1 in popolazioni di macrofagi, forniscono ulteriori indicazioni circa i potenziali meccanismi attraverso cui le Fumonisine possono incrementare lo stress ossidativo e il danno cellulare (10). L'espressione della SOD è risultata significativamente ridotta dalla presenza di basse concentrazioni di AFB_1 nel mezzo di coltura (5 µg/mL) nel caso d'incubazione a 7 giorni. L'effetto della Tossina T-2 si è manifestato con una significativa riduzione d'espressione sia della SOD che della GSH-Px ($p<0,05$), enzima quest'ultimo che è risultato depresso anche dall'esposizione al DON ad elevate concentrazioni (5 µg/mL), tanto a 2 che a 7 giorni d'incubazione ($p<0,01$). L'esposizione alla FB_1 ha prodotto una riduzione dose-dipendente della sintesi di mRNA per la SOD a 7 giorni d'incubazione ($p<0,05$) e per la GSH-Px sia nel caso di linfociti incubati per 2 che per 7 giorni ($p<0,05$). Per quanto riguarda l'espressione genica di SOD e GSH-Px, in termini generali è stato osservato un decremento a fronte di incrementi consistenti dei ROM e del contenuto cellulare di MDA, quest'ultimo anche in assenza di una sostenuta deplezione di tioli intracellulari come osservato nel caso di esposizione a T-2 e DON. In questo caso è ipotizzabile che i Tricoteceni testati su linfociti bovini non siano in grado, *in vitro*, di indurre tossicità mediante stress ossidativo anche in presenza di lipoperossidazione delle membrane. I risultati ottenuti, indicano come vi siano delle differenze nell'effetto che tricotecenti (DON e T-2), da un lato, e AFB_1 e FB_1 dall'altro sull'espressione linfocitaria di SOD e GSH-Px. Infatti l'esposizione a bassi livelli di DON e Tossina T-2 sembra incrementare la sintesi di mRNA per entrambi gli enzimi. Precedenti studi *in vivo* e i*n vitro* hanno peraltro dimostrato come il DON, e altri Tricoteceni, possano modulare le funzioni immunologiche in vario modo e come, a bassi dosaggi, possono potenziare o deprimere l'espressione genica di cellule del sistema immunitario (4). A titolo di conferma è stato verificato che il DON alla concentrazione di 250 µg/mL *in vitro* sia capace d'incrementare il legame del fattore di trascrizione NF-κB and AP-1 nei linfociti-T (40) e nei macrofagi (41). Per tali fattori di trascrizione è nota la capacità, sotto l'effetto di moderate condizioni di stress cellulare, di indurre l'espressione di geni relativi alla sopravvivenza, al differenziamento e alla crescita delle cellule (26, 42). La riduzione nel livello d'espressione genica manifestato come caso generale e più specificamente solo ad alti livelli di T-2 e DON, può essere considerato come risultato del ben noto effetto inibitorio esplicato da alcune micotossine sulla sintesi proteica o sui processi apoptotici (43). In considerazione di tali evidenze, lo stato di stress ossidativo delle PBMC bovine osservato nel corso dello studio, può essere interpretato come conseguenza, anziché come causa, di tossicità cellulare indotta dalle micotossine. In accordo con tale visione, è stato speculato come l'esposizione a FB_1 sia responsabile della perturbazione di delicati equilibri tra integrità strutturale delle membrane e suscettibilità della cellula, o suoi componenti, al danno ossidativo (44). La compromissione chimico-strutturale delle membrane dovuto a lipoperossidazione può inoltre contribuire al verificarsi di danno ossidativo a carico del DNA con possibili effetti genotossici come dimostrato su linfociti caprini esposti ad AFB_1 (45).

Conclusioni

Il modello sperimentale utilizzato per studiare il potenziale ossidativo e citotossico di alcune micotossine, è risultato di pratica applicabilità, sensibile e non invasivo. Il linfocita bovino risulta influenzato dall'esposizione *in vitro* alle micotossine, spesso in maniera tempo- e/o dose-dipendente con effetti riconducibili allo stress ossidativo. Il presente studio contribuisce a

chiarire i meccanismi attraverso cui le micotossine inducono stress ossidativo nei sistemi cellulari animali. Le risultanze sperimentali e la letteratura consultata, suggeriscono l'ipotesi che lo stress ossidativo sia da considerare quale risultato finale dell'azione tossica delle micotossine e che la conseguente riduzione della sintesi e della disponibilità di difese antiossidanti, intensificherebbe il verificarsi del danno cellulare. L'alterazione delle popolazioni linfocitarie può essere responsabile della depressione della risposta immunitaria in animali esposti alle micotossine, rendendoli maggiormente suscettibili alle malattie.

Bibliografia

1. Betina V. Structure-activity relationships among mycotoxins. *Chemico-Biological Interactions* 1989;71:105-146.
2. Ueno Y, Ishii K, Sakai K, Kanaeda S, Tsunoda H, Tanaka T, Enomoto M. Toxicological approaches to metabolites of Fusaria. IV. Microbial survay ``bean-hulls poisoning of horses'' with the isolation of toxic trichothecenes, neosolaniol and T-2 toxin of Fusarium solani M-1-1. *Japan J Exper Med* 1972;42:210-8.
3. Gelderblom WCA, Abel S, Smuts CM, Marnewick J, Marasas WFO, Lemmer ER, Ramljak D. Fumonisins induced hepatocarcinogenesis: mechanisms related to cancer initiation and promotion. *Environmental Health Perspectives.* 2001;109:291-300.
4. Bondy GS, Pestka JJ. Immunomodulation by fungal toxins. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews* 2000;3(2):109-43.
5. Pugh GW, Richard JL, Kpecky KE, McDonald TJ. Effect of aflatoxin ingestion on the development of *Moraxella bovis* infectious bovine keratoconjunctivitis. *The Cornell Veterinarian* 1984;74:96-110.
6. Mann DD, Buening GM, Osweiler GD, Hook BS. Effect of subclinical levels of T-2 toxin on the bovine cellular immune system. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 1984;48:308-12.
7. Charoenpornsook K, Fitzpatrick JL, Smith JE. The effects of four mycotoxins on the mitogen stimulated proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Mycopathologia* 1998; 143:105-11.
8. Tiemann U, Brüssow K-P, Jonas L, Pöhland R, Schneider F, Dänicke S. Effects of diets with cereal grains contaminated by graded levels of two Fusarium toxins on selected immunological and histological measurements in the spleen of gilts. *Journal of Animal Science* 2006;84:236-45.
9. Atroshi F, Rizzo A, Westermarck T, Ali-Vehmas T. Effects of tamoxifen, melatonin, coenzyme Q_{10}, and L-carnitine supplementation on bacterial growth in the presence of mycotoxins. *Pharmacological Research* 1998;38(4):289-95.
10. Ferrante, MC, Meli R, Mattace Raso G, Esposito E, Severino L, Di Carlo G, Lucidano A. Effetts of Fumonisin B1 on structure and function of macrophage plasma membrane. *Toxicology Letters* 2002;129:181-7.
11. Müller G, Burkert B, Möller U, Diller R, Rohrmann B, Rosner H, Köhler H. Ochratoxin A and some of its derivatives modulate radical formation of porcine blood monocytes and granulocytes. *Toxicology* 2004;199:251-9.
12. Selkirk JK, Croy RG, Whitlock JP Jr, Gelboin HV. *In vitro* metabolism of benzo(a)pyrene by human liver microsomes and lymphocytes. *Cancer Research* 1975;35:3651-5.
13. Lacetera N, Franci O, Scalia D, Bernabucci U, Ronchi B, Nardone A. Effects on functions of ovine blood mononuclear cells for each of several fatty acids at concentrations found in plasma of healthy and ketotic ewes. *American Journal of Veterinary Research* 2002;63:958-62.

14. Bodine AB, Fisher SF, Gangjee S. Effect of Aflatoxin B1 and major metabolites on phytohemeagglutinin-stimulated lymphoblastogenesis of bovine lymphocytes. *Journal of Dairy Science* 1984;67(1):110-4.
15. Neldon-Ortiz DL, Qureshi MA. The effects of direct and microsomal activated aflatoxin B1 on chicken peritoneal macrophages *in vitro*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1992;31:61-76.
16. Lee MG, Li S, Jarvis BB, Pestka JJ. Effects of satratoxins and other macrocyclic trichothecenes on IL-2 production and viability of EL-4 thymoma cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1999:57:459-474.
17. Berek L, Petri IB, Mesterhàzy A, Téren J, Molnàr J. Effects of mycotoxins on human immune functions *in vitro*. *Toxicology in Vitro* 2001;15:25-30.
18. Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2005;88:2017-26.
19. Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *Journal of Dairy Science* 2002;85:2173-9.
20. Kusmic C, Picano E, Busceti CL, Petersen C, Barsacchi R. The antioxidant drug dipyridamole spares the vitamin E and thiols in red blood cells after oxidative stress. *Cardiovascular Research* 2000;17:510-4.
21. Fenaille F, Mottier P, Turesky RJ, Ali S, Guy PA. Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powder. *The Journal of Chromatography A* 2001;921:237-45.
22. Bernabucci U, Ronchi B, Basificò L, Pirazzi D, Rueca F, Lacetera N, Nardone A. Abundance of mRNA of apolipoprotein B100, apolipoprotein E and microsomal triglyceride transfer protein in liver from periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 2004;87:2881-8.
23. Klaunig EJ, Kamendulis LM. Role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. In: Fuchs J, Packer L (Ed.) *Environmental Stressors in health and disease*. Roudledge, USA; 2001. p. 81-102.
24. Rizzo A, Atroshi F, Hirvi T, Saloniemi H. The hemolytic activity of deoxynivalenol and T-2 toxin. *Natural Toxins.* 1992;1:106-10.
25. Liu J, Yang CF, Lee BL, Shen HM, Ang SG, Ong CN. Effect of *Salvia miltiorrhiza* on aflatoxin B1-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Free Radical Research* 1999;31:559-68.
26. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*.* *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007;39:44-84.
27. Lakritz J, Leonard MJ, Eichen PA, Rottinghaus GE, Johnson GC, Spiers DE. Whole-blood concentrations of glutathione in cattle exposed to heat stress or a combination of heat stress and endophyte-infected tall fescue toxins in controlled environmental conditions. *American Journal of Veterinary Research* 202;63:799-803
28. Rizzo AF, Atroshi F, Ahoputa M, Sankari S, Elovaara E. Protective effect of antioxidants against free radical-mediated lipid peroxidation induced by DON or T-2 toxin. *Journal of Veterinary Medicine Series A*- 1994;41.81-90.
29. Klaric AS, Pepelinjac D, Domijan AM, Petril J. Lipid peroxidation and glutathione levels in Porcine Kidney PK15 cells after individual and combined treatment with fumonisn B1, beauvericin and Ochratoxin A. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2006;100:157-64.
30. Stockmann-Juvala H, Mikkola J, Naarala J, Loikkanen J, Elovaara E, Savolainen K. Oxidative stress induced by Fumonisin B1 in continuous human and rodent neural cell cultures. *Free Radical Research* 2004;38(9):933-42.

31. McLean M, Dutton MF. Cellular interactions and metabolism of Aflatoxin: an update. *Pharmacology & Therapeutics* 1995;65:163-92.
32. Jefferies H, Coster J, Khalil A, Bot J, McCauley RD, Hall JC. Glutathione. *ANZ Journal of Surgery* 2003;73:517-22.
33. Vaca CE, Wilhelm J, Hartwig A, Harms-Ringdahl M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutation Research* 1988;195:137–49.
34. Chen JJ, Yu BP. Alteration in mitocondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radical Biology and Medicine* 1994;17:411-8.
35. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1993;57:715S-25S.
36. Esterbauer H, Cheeseman KH Dianzani MU, Poli G, Slater TF. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe2+ in rat liver microsomes. *Biochemical Journal* 1982;208:129-40.
37. Marnett LJ. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research* 1999;424:83-95.
38. Wang MY, Liehr JG. Lipid hydroperoxide-induced endogenous DNA adducts in hamsters: possible mechanism of lipid hydroperoxide-mediated carcinogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1995;316:38-46.
39. Baudrimont I, Ahouandjivo R, Creppy EE. Prevention of lipid peroxidation induced by ochratoxin A in Vero cells in culture by several agents. *Chemico-Biological Interactions* 1997;104:29–40.
40. Li S, Ouyang Y, Yang G-H, Pestka JJ. Modulation of Transcription Factor AP-1 Activity in Murine EL-4 Thymoma Cells by Vomitoxin (Deoxynivalenol). *Toxicology and Applied Pharmacology* 2000;163:17–25.
41. Wong S-S, Zhou H-R, Pestka JJ. Effects of vomitoxin (deoxynivalenol) on the binding of transcription factors AP-1, NF-κB, and NF-IL6 in raw 264.7 macrophage cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 2002;65(16):1161-80.
42. Sablina, AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nature Medicine* 2005;11(12):1306-13.
43. Eriksen GS, Pettersson H. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 2004,114:205-39.
44. Yin JJ, Smith MJ, Eppley RM, Page SW, Sphon JA. Effects of Fumonisin B1 on lipid peroxidation in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998;1371:134-42.
45. Vitali A, Danieli PP, Bernabucci U, Lacetera N, Nardone A, Ronchi B. Assessment of genotoxicity and cytotoxicity of AFB1 by peripheral blood mononuclear cells in goats. In: *Proceedings of the 58th Annual Meeting of the EAAP. Dublin (Ireland) August 26-29, 2007*.

VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI MICOTOSSINE NASCOSTE NEI CEREALI MEDIANTE DIGESTIONE GASTROINTESTINALE SIMULATA

Claudia Falavigna, Chiara Dall'Asta, Gianni Galaverna, Arnaldo Dossena, Rosangela Marchelli
Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi, Parma

Introduzione

Le Fumonisine sono metaboliti secondari tossici prodotti da diverse specie fungine appartenenti al genere *Fusarium*, in particolare da *Fusarium verticilloides*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium nygamai* e *Fusarium proliferatum*. Quelle appartenenti al gruppo B, in particolare FB_1, FB_2 ed FB_3 rappresentano le forme più abbondantemente prodotte dai suddetti ceppi e si ritrovano soprattutto quali contaminanti del mais (1). Chimicamente sono definibili come polidrossialchilammine che portano due unità tricarballiliche esterificate su una catena alifatica a venti atomi di carbonio (2). La tossicità di tali metaboliti è dovuta all'elevata somiglianza strutturale con la sfingosina, che ne determina la capacità di inibire l'enzima ceramide-sintasi, portando ad un accumulo intracellulare di sfingoidi con un conseguente aumento del rapporto sfinganina/sfingosina (3). Le Fumonisine del gruppo B sono pertanto responsabili di diverse tossicosi sugli animali, tra cui leucoencefalomalacia equina (ELEM) ed edema polmonare suino (PPE). Sull'uomo esiste invece una correlazione statistica tra l'esposizione ad FB_1 e l'incidenza di cancro esofageo (1). Per queste ragioni le Fumonisine sono state inserite dalla IARC (*International Agency of Research on Canc*er) all'interno della classe 2 B, della quale fanno parte le sostanze potenzialmente cancerogene per l'uomo. Con il Regolamento 1126/2007 l'Unione Europea ha definito i limiti massimi di Fumonisine totali accettabili nelle materie prime, semilavorati e prodotti finiti adibiti ad uso umano: 4000 µg/kg per mais non processato, 1000 µg/kg per mais destinato al consumo umano, 800 µg/kg per cereali per la prima colazione e snack a base di mais e 200 µg/kg per gli alimenti destinati all'infanzia (4).

Recentemente è emerso che nelle materie prime e negli alimenti contaminati da micotossine possono essere presenti, oltre alle forme native, diversi derivati coniugati con gruppi maggiormente polari o associati covalentemente o non-covalentemente con i macrocostituenti della matrice, noti come micotossine coniugate, nascoste o mascherate. Questi composti hanno delle caratteristiche chimiche diverse rispetto a quelle delle micotossine libere e pertanto non sono rivelabili con i metodi di analisi comunemente impiegati ma possono, tuttavia, contribuire alla tossicità globale in quanto tali o in seguito alla liberazione dei precursori durante i processi tecnologici o di digestione (5). Alcuni studi riportano la presenza di forme legate delle Fumonisine nei prodotti finiti a base di mais come, ad esempio, cornflakes o tortilla (6), ma anche in prodotti poco processati come farina, pane e pasta e nelle materie prime. Un ulteriore fenomeno di crescente interesse è rappresentato dal "paradosso delle Fumonisine", secondo il quale tali metaboliti vengono per il 90% eliminati per via fecale quando somministrati per via orale, esercitando tuttavia un elevato effetto tossico (7). Questo fatto potrebbe in parte essere spiegato se fosse evidenziata per queste micotossine una bioaccessibilità (ovvero la quantità di una sostanza che, dopo digestione, si libera dalla matrice ed è disponibile per l'assorbimento da parte dell'epitelio intestinale) maggiore in seguito a digestione, dovuta alla liberazione delle

forme nascoste la cui entità non è stimabile con le comuni tecniche di analisi. In questo studio è stato applicato un modello di digestione *in vitro* (8, 9) a granelle di mais e a prodotti a base di mais: mediante l'applicazione di tre *step* che simulano bocca, stomaco e piccolo intestino, sono state riprodotte le condizioni e i processi a cui vanno incontro gli alimenti durante il processo digestivo al fine di valutare l'effettiva presenza di Fumonisine nascoste che potenzialmente possono essere rilasciate dalla matrice esposta all'azione idrolitica degli enzimi presenti in ambito gastrointestinale e stimarne, quindi, la bioaccessibilità.

Materiali e metodi

Reagenti

Le soluzioni standard di FB_1 e FB_2 in miscela (50 µg/mL) e FB_3 (50 µg/mL), entrambe in acqua/acetonitrile (1:1), sono state fornite da Biopure (Tulln, Austria). Il metanolo utilizzato per le analisi HPLC (*High Perfomance Liquid Chromatography*) è stato fornito da Carlo Erba (Milano, Italia), mentre l'acetonitrile è stato fornito da J.T. Baker (Mallinckrodt Backer, Phillipsburg, NJ, USA). L'acqua bidistillata è stata prodotta in laboratorio, utilizzando un sistema Alpha-Q-System (Millipore, Marlborough, MA, USA). Cloruro di potassio, cloruro di sodio, cloruro di ammonio, diidrogeno fosfato di potassio, carbonato di sodio e cloruro anidro di calcio sono stati forniti da Carlo Erba (Milano, Italia), tiocianato di potassio e solfato di sodio sono stati forniti da Riedel de Haën (Hannover, Germania), il diidrogenofosfato monoidrato di sodio è stato fornito da Fluka (Chemika-Biochemika, Basilea, Svizzera) e il cloruro di magnesio esaidrato è stato fornito da Merck (Darmstadt, Germania). Urea (98%), D-(+)-glucosio (99,5%), acido D-glucuronico e glucosammina (99%) sono stati forniti da Sigma (Stoccarda, Germania). Idrossido di potassio e acido cloridrico (37%) sono stati ottenuti da Carlo Erba (Milano, Italia). Tutti gli enzimi e i costituenti dei succhi digestivi artificiali (mucina di tipo III di stomaco suino, acido urico, α-amilasi di tipo VIII A da malto d'orzo, sieroalbumina bovina, pepsina da mucosa gastrica suina, pancreatina da pancreas suino, lipasi di tipo III da pancreas suino e bile bovina e ovina, sono stati forniti da Sigma (Stoccarda, Germania).

Estrazione di Fumonisine libere da mais grezzo e prodotti a base di mais

5 g di mais grezzo macinato vengono estratti con 40 mL di miscela estraente composta da acqua/metanolo (30:70 v/v) e omogeneizzati (Ultraturrax T50 Basic, Ika Laborator Technik, Stauffen, Germania) per 3 minuti a 6000 rpm. Dopo filtrazione con filtro a pieghe 1 mL viene prelevato per l'analisi in LC-ESI-MS/MS (*Liquid Chromatography-Electron Spray Ionization Tandem Mass Spectrometry*). Nel caso dei prodotti alimentari (generalmente meno contaminati), l'estrazione avviene sempre secondo le stesse modalità, ma partendo da 10 g di matrice. Dopo filtrazione, 4 mL di estratto vengono portati a secco sotto flusso di N_2 e il residuo secco viene ripreso con 1 mL di acqua/metanolo (30:70 v/v) prima dell'analisi in LC-ESI-MS/MS.

Modello di digestione *in vitro*

Il modello di digestione riproduce in modo semplificato le condizioni fisiologiche del tratto gastrointestinale umano, in termini di composizione dei fluidi digestivi, pH e tempi di permanenza dell'alimento in ogni compartimento. È stato pertanto impiegato il protocollo

messo a punto da Versantvoort *et al*. (2005) il quale simula i processi digestivi che hanno luogo dopo che un'alimento è stato somministrato ad un soggetto a digiuno. La preparazione delle soluzioni saline e dei succhi gastrici artificiali (saliva, succo gastrico, succo duodenale e bile) è stata effettuata secondo quanto previsto da questo modello (9).

Prima di iniziare gli esperimenti tutte le soluzioni vengono preriscaldate a 37 ± 2° C. La digestione comincia aggiungendo 2 g di campione macinato a 3 mL di saliva (contenente l'enzima α-amilasi), già portata a temperatura. Dopo 5 minuti vengono aggiunti 6 mL di succo gastrico (nel quale l'enzima preposto alla digestione è la pepsina) e la miscela viene lasciata incubare per 2 ore prima dell'aggiunta simultanea di 6 mL di succo duodenale (contenente pancreatina e lipasi), 3 mL di bile e 1 mL di carbonato di sodio (1 M). Successivamente a quest'ultima aggiunta, si attende un periodo di altre 2 ore prima di considerare terminato l'esperimento. Durante tutta la durata della digestione *in vitro* la miscela viene mantenuta in agitazione, mediante ancoretta magnetica (250 rpm), a 37 ± 2° C grazie all'ausilio di una piastra riscaldante e il pH viene controllato ogni 2 ore con cartina tornasole. Il pH finale del chimo deve trovarsi in un range compreso tra 6,5-7,0. Al termine del processo il campione viene trasferito in falcon e centrifugato a 3500 rpm per 15 minuti. Si ottiene così la separazione del chimo (il surnatante) dalla matrice digerita (il pellet). La concentrazione delle micotossine viene determinata nel chimo, previo *desalting* e *clean-up* del campione mediante cartucce Sep-Pak C18 (Waters Co, Milford, MA, USA).

Clean-up dei campioni mediante cartucce Sep-Pak C18

Allo scopo di rimuovere i sali e gli enzimi dai campioni sottoposti a digestione prima dell'analisi, questi vengono sottoposti a *clean-up* mediante colonnine Sep-Pak dotate di fase stazionaria C18. La rappresentazione schematica del modello di digestione *in vitro* e delle fasi di preparazione del campione che ne seguono è riportata in Figura 1.
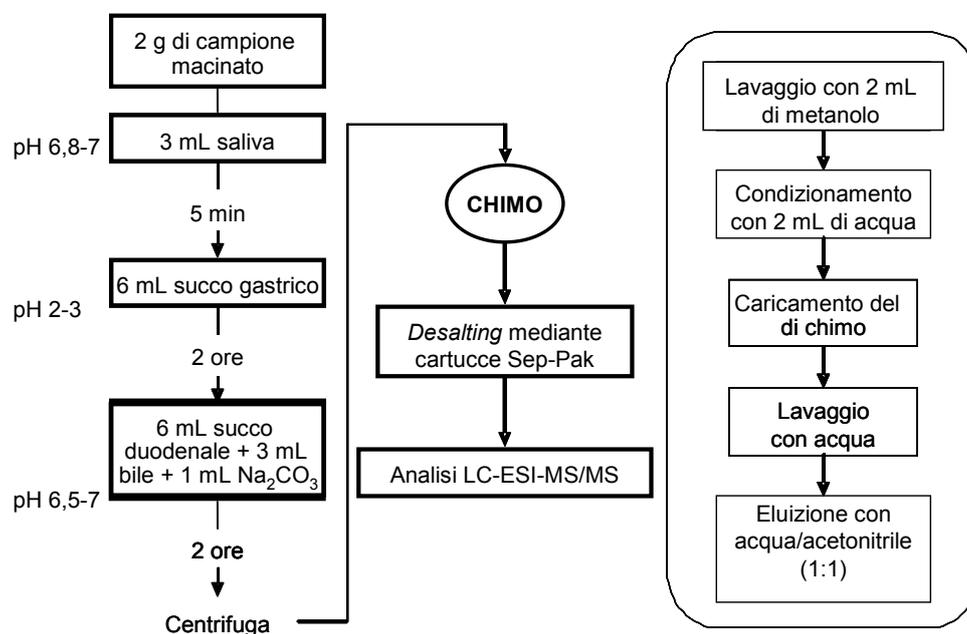
Figura 1. Rappresentazione schematica del modello di digestione *in vitro* qui applicato e del *desalting* del chimo grezzo prima dell'analisi

Prima di caricarvi il campione, le cartucce vengono precondizionate con 2 mL di metanolo e con 2 mL di acqua bidistillata. Dopo aver caricato ed eluito 2 mL di chimo, le cartucce vengono lavate con altri 2 mL di acqua bidistillata e gli analiti vengono quindi eluiti con 2 mL di una miscela acqua/acetonitrile (1:1). 1 mL viene quindi portato a secco sotto flusso di N_2 e il residuo viene ripreso con lo stesso volume di acqua/metanolo (30:70) prima dell'analisi in LC-ESI-MS/MS. Data la minore contaminazione del campione di partenza, nel caso dei prodotti alimentari il volume di chimo sottoposto a purificazione è pari a 4 mL. Dopo eluizione dei composti in esame, 3,5 mL vengono portati a secco e il residuo viene ripreso con 1 mL della miscela acqua/metanolo (30:70), al fine di ottenere una certa riconcentrazione degli analiti.

Analisi LC-ESI-MS/MS

Le analisi LC-ESI-MS/MS sono state effettuate utilizzando un HPLC Alliance 2695 (Waters Co., Milford, MA, USA), accoppiato con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo Quattro MicroTM API con sorgente Electrospray (Micromass, Waters, Manchester, UK). Le condizioni cromatografiche impiegate sono le seguenti: Colonna: C18 XTerra (250 mm x 2,1 mm, 5 µm); flusso 0,2 mL/min; temperatura della colonna, 30°C; volume di iniezione, 10 µL; il gradiente di eluizione è stato ottenuto utilizzando acqua (eluente A) e metanolo (eluente B) acidificati entrambi allo 0,2% con acido formico; condizioni iniziali al 70% di A, 0-2 minuti condizioni isocratiche, 2-5 minuti al 45% di B, 5-25 minuti al 90% di B, 25-35 minuti condizioni isocratiche al 90% di B, 35-36 minuti ripristino delle condizioni iniziali al 70% di A, 36-50 minuti ricondizionamento al 70% di A (tempo totale di analisi: 50 minuti). Parametri di MS: ESI+ (modalità di ionizzazione positiva); voltaggio del capillare, 4,0 kV; Cono, 50 kV; Estrattore, 2 V; temperatura della sorgente, 120°C; temperatura di desolvatazione, 350°C; flusso del gas del cono e del gas di desolvatazione (azoto), 50 L/h e 700 L/h, rispettivamente. La rivelazione è stata effettuata utilizzando la modalità operativa Multiple Reaction Monitoring (MRM), monitorando due transizioni per ogni analita. Le transizioni scelte per ogni analita e le relative energie di collisione sono riportate in Tabella 1.

Tabella 1. Transizioni monitorate per ogni analita e relative energie di collisione.

Analita	Transizione monitorata	Energie di collisione (eV)
FB_1	722,4 → 334,4	40
	722,4 → 352,4	35
FB_2 – FB_3	706,4 → 336,4	35
	706,4 → 318,4	35

La prima transizione riportata è quella che viene impiegata per quantificare, mentre la seconda è stata scelta come qualitativa.

Risultati e discussione

Prove preliminari di recupero su cartucce Sep-Pak

Considerata l'elevata concentrazione salina del chimo al termine della digestione, prima di effettuare gli esperimenti si è reso necessario mettere a punto una procedura di *desalting* e *clean-up* che consentisse di allontanare i sali e gli enzimi al fine di rendere i campioni idonei all'analisi LC-ESI-MS/MS. Il sistema proposto prevede l'impiego di cartucce Sep-Pak dotate di

fase stazionaria apolare. Sono state pertanto effettuate delle prove preliminari di recupero, sottoponendo a *clean-up* una soluzione a concentrazione nota di FB_1 (pari a 500 ng/g). Dopo avere eluito il campione, tutte le frazioni di lavaggio della cartuccia (acqua, acqua/acetonitrile e acetonitrile) sono state recuperate e analizzate in LC-ESI-MS/MS per individuare in quali di queste la tossina venisse eluita e valutarne quindi il recupero, attraverso il confronto diretto con una soluzione della medesima concentrazione, ma analizzata senza che questa venisse sottoposta al passaggio su Sep-Pak (controllo). In seguito all'analisi si è potuto notare che gli analiti eluiscono in un'unica frazione di lavaggio, rappresentata da acqua/acetonitrile (1:1), con un recupero pari al 100%, come mostrato in Figura 2, dove sono state messe a confronto le aree relative allo ione quantitativo (m/z: 334,4) di FB_1, rispettivamente della soluzione standard analizzata tal quale e della soluzione di uguale concentrazione sottoposta a *clean-up*.
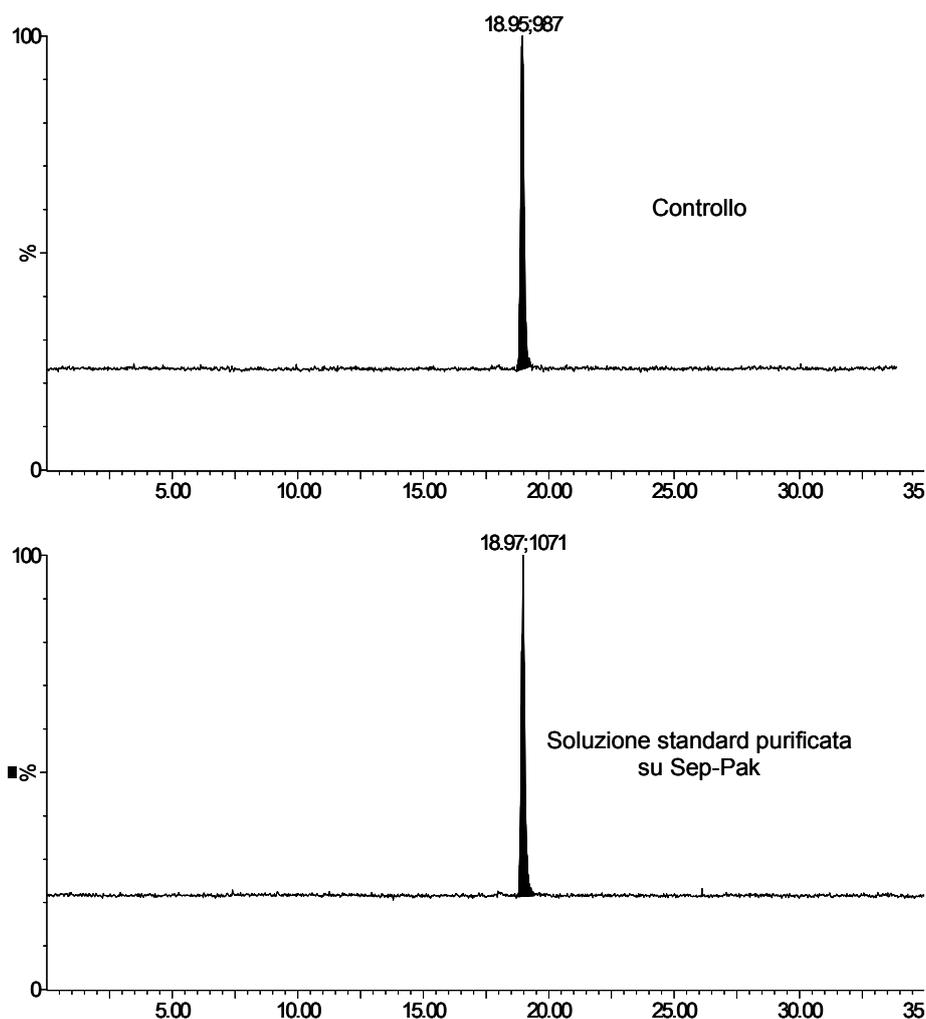
Figura 2. Confronto tra soluzioni standard di FB_1. In alto: standard analizzato tal quale (controllo); in basso: soluzione standard passata su Sep-Pak

Si è quindi deciso di impiegare tale metodo per il *desalting* di tutti i campioni di mais e prodotti a base di mais sottoposti a digestione.

Digestione *in vitro* di una soluzione standard di FB_1

Prima di procedere con la digestione dei campioni, il protocollo è stato applicato ad una soluzione a concentrazione nota di FB_1 (pari a 5000 ng/g) allo scopo di valutare la possibilità, da parte degli enzimi coinvolti e delle drastiche condizioni in cui la tossina viene a trovarsi durante il processo, di degradazione dell'analita. Il risultato ottenuto dall'analisi dello standard digerito è stato quindi confrontato con quello fornito dall'analisi di una soluzione standard di controllo di FB_1 a 250 ng/g, concentrazione attesa dal campione sottoposto all'esperimento, qualora non si fosse verificata alcuna degradazione dell'analita. La Figura 3 mostra il confronto tra le aree (ricavate sempre per lo ione quantitativo della tossina in esame) di FB_1 nella soluzione di controllo e nella soluzione alla quale è stato applicato il protocollo di digestione.
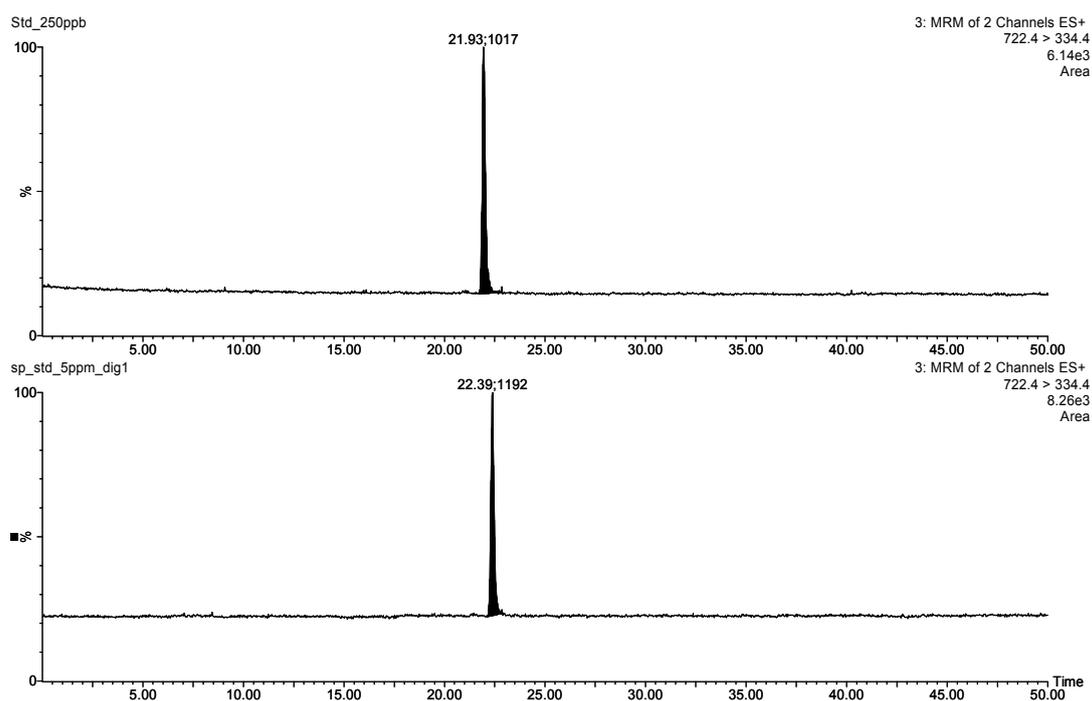
Figura 3. Confronto tra le aree di FB_1 nella soluzione di controllo (sopra) e di FB_1 in seguito a digestione (sotto)

I risultati conseguiti da questa ulteriore prova preliminare hanno permesso di evidenziare che le Fumonisine non vengono degradate o idrolizzate nel corso della digestione.

Confronto tra digestione *in vitro* e idrolisi alcalina

Il modello di digestione è stato inizialmente applicato a quattro campioni di mais naturalmente contaminati. I risultati ottenuti, espressi come somma di FB_1, FB_2 e FB_3, sono stati confrontati con quelli conseguiti impiegando una procedura di estrazione di routine (descritta precedentemente) e coi livelli di Fumonisine totali rivelati in seguito ad idrolisi basica (10). Quest'ultimo metodo consiste in un'idrolisi chimica effettuata impiegando KOH (2 N) allo

scopo di scindere dalle Fumonisine allo stato nativo le unità tricarballiliche, con il conseguente rilascio delle forme idrolizzate (rivelate come HFB ed espresse come somma di FB_1, FB_2 e FB_3 equivalenti) dalla matrice. In Figura 4 sono riportate le strutture chimiche di FB_1 e della corrispondente forma idrolizzata, HFB_1.
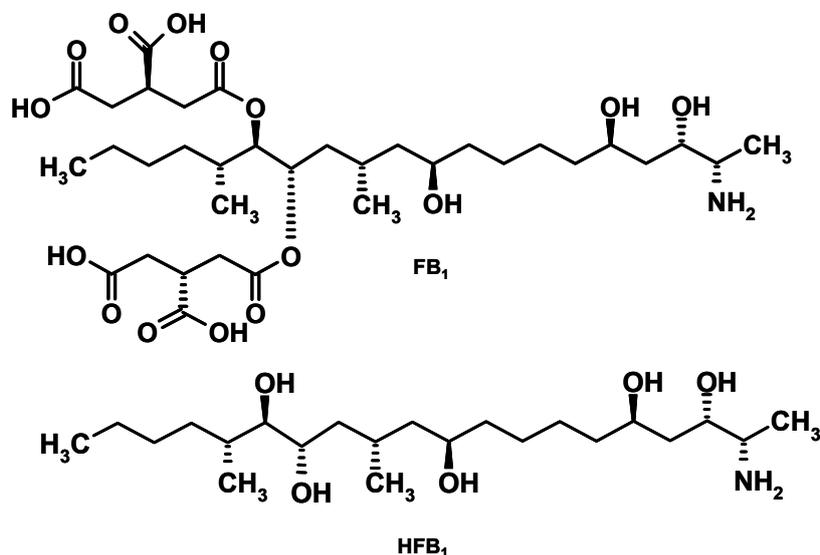
Figura 4. Strutture chimiche di FB_1 e del suo analogo idrolizzato, HFB_1

Ogni campione è stato analizzato in doppio e le concentrazioni degli analiti sono state calcolate sulla base di rette di taratura costruite in matrice (utilizzate per Fumonisine libere estratte con la procedura di routine e per HFB) e rette di taratura costruite su standard esterno (impiegate per Fumonisine libere rivelate in seguito a digestione *in vitro*). In Figura 5 sono riportati i risultati conseguiti e il confronto tra i livelli di Fumonisine libere estraibili con la procedura di estrazione adottata nel presente lavoro, Fumonisine totali rivelate dopo idrolisi alcalina e Fumonisine totali riscontrate in seguito a digestione *in vitro* dei campioni.
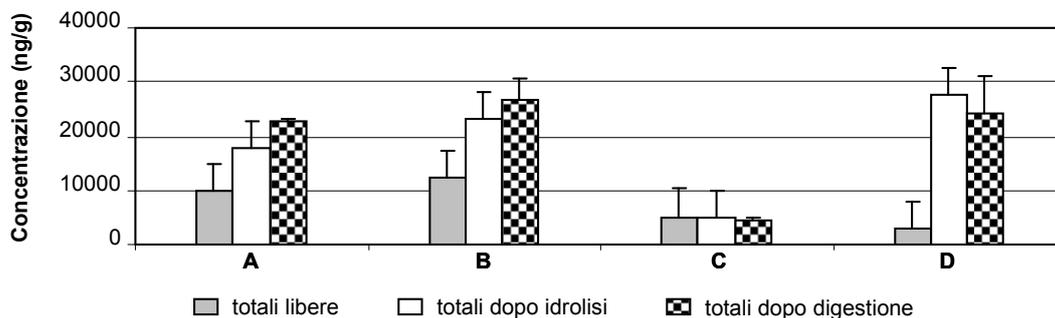
Figura 5. Confronto tra Fumonisine totali (somma di FB_1, FB_2 e FB_3) libere estraibili, totali rivelate dopo idrolisi (quantificate come HFB ed espresse come somma di FB_1, FB_2 e FB_3 equivalenti) e totali riscontrate dopo digestione (somma di FB_1, FB_2 e FB_3)

Come si può notare, i livelli di Fumonisine totali dopo digestione in tre casi su quattro sono maggiori rispetto a quelli riscontrati mediante una tecnica di estrazione convenzionale. Si nota inoltre un buon accordo coi dati ottenuti per idrolisi basica, con la differenza che in seguito a digestione sono rivelabili solo Fumonisine nella loro forma nativa. Ciò dimostra che gli enzimi coinvolti nei processi digestivi (α-amilasi nella saliva, pepsina nel succo gastrico, pancreatina e lipasi nel succo duodenale) sono in grado di distruggere l'interazione Fumonisina-matrice, portando così alla liberazione della frazione nascosta altrimenti non rivelabile senza l'applicazione di uno *step* di idrolisi chimica.

Digestione *in vitro* di campioni di mais e prodotti a base di mais

Al fine di valutare la biodisponibilità delle Fumonisine nel piccolo intestino, nella seconda parte del presente studio il protocollo di digestione è stato impiegato nell'analisi di campioni di granella di mais e di prodotti a base di mais. I livelli di Fumonisine riscontrati dopo digestione sono stati confrontati con quelli riferiti alle Fumonisine libere estraibili. I risultati sono riassunti in Figura 6, relativa all'analisi di campioni di granelle di mais, e in Figura 7, che invece riporta il confronto tra Fumonisine totali libere e Fumonisine totali rivelate dopo digestione relativamente ai prodotti a base di mais.
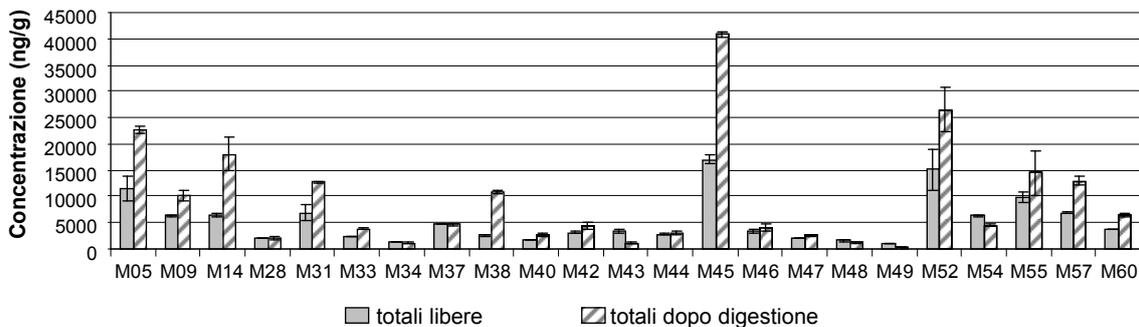
Figura 6. Digestione *in vitro* di campioni si mais: confronto tra i livelli di Fumonisine totali rivelati mediante una metodica di estrazione comune e in seguito a digestione
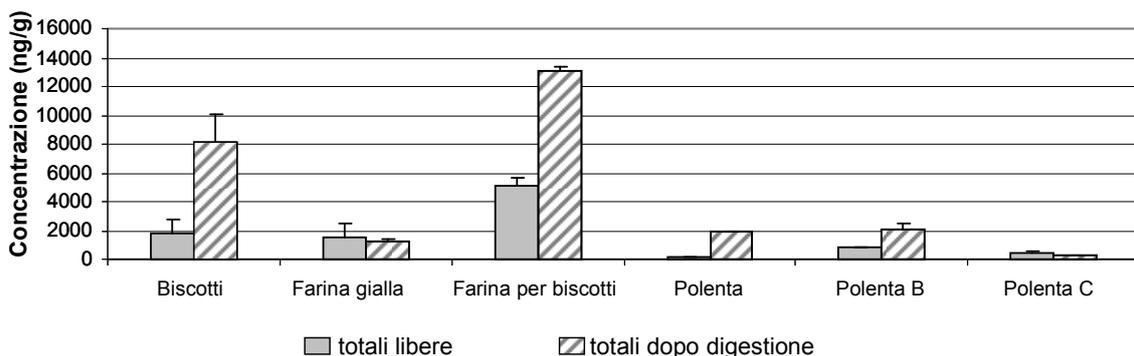
Figura 7. Digestione *in vitro* di prodotti alimentari a base di mais: confronto tra i livelli di Fumonisine totali determinate mediante estrazione convenzionale e in seguito a digestione

Il fatto che nella maggior parte dei casi dopo digestione si assista ad un incremento di Fumonisine totali dimostra che la quantità di contaminante disponibile per l'assorbimento intestinale è generalmente più elevata rispetto a quella stimata con le comuni metodiche di analisi. Osservando i dati relativi all'analisi dei campioni di mais grezzo, inoltre, si nota una certa correlazione tra l'entità di micotossine nascoste e il grado di contaminazione da Fumonisine libere: per campioni che mostrano già in partenza un'elevata concentrazione di Fumonisine libere estraibili si rivela in seguito a digestione un quantitativo di Fumonisine molto più elevato, mentre in campioni dove la concentrazione di Fumonisine libere è più bassa non si nota una differenza significativa tra i livelli di Fumonisine estratte e quelli ottenuti dopo digestione. Nel caso dei prodotti alimentari a base di mais si osserva nella maggior parte dei casi uno scarso incremento di Fumonisine dopo applicazione del modello, soprattutto per quei campioni la cui lavorazione è relativamente semplice (come, ad esempio, la polenta).

Conclusioni

L'applicazione del modello di digestione *in vitro* ha permesso di osservare il comportamento delle Fumonisine durante il processo digestivo. È stato innanzitutto osservato un buon accordo tra i dati ottenuti dalle digestioni e quelli acquisiti in seguito all'applicazione di uno *step* di idrolisi alcalina: questo conferma il fatto che l'azione enzimatica è in grado di liberare le forme mascherate associate ai componenti dell'alimento. Dall'analisi dei campioni di mais e dei prodotti a base di mais, come tendenza generale si è notato un incremento dei livelli di Fumonisine libere in seguito alla digestione, fatto che dimostra che la quantità di micotossine disponibile per l'assorbimento nel piccolo intestino è solitamente più alta rispetto a quanto stimato con le comuni tecniche di analisi. Questi risultati, pertanto, aprono una problematica più ampia: infatti, mentre con il metodo di idrolisi chimica si evidenzia la presenza di forme nascoste altrimenti non rivelabili, con gli esperimenti effettuati nel presente lavoro si nota chiaramente che gli enzimi coinvolti sono in grado di liberare tale frazione durante i processi digestivi che hanno luogo dopo il consumo dell'alimento, rendendo quindi la frazione nascosta effettivamente bioaccessibile. Emerge di conseguenza non solo una problematica analitica, legata al fatto che le metodiche di routine comportano una chiara sottostima della reale contaminazione da Fumonisine di materie prime e prodotti finiti, ma anche un problema legato alla tutela della salute dei consumatori, il cui livello di esposizione al fattore di rischio è concretamente maggiore di quello stimato sulla base dei normali controlli.

Bibliografia

1. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 2003;497-516.
2. Sweeney MJ, Dobson ADW. Mycotoxin production by *Aspergillus, Fusarium* and *Penicillium*. *International Journal of Food Microbiology* 1998;43:141-58.
3. Carratù MR, Cassano T, Coluccia A, Borracci P, Cuomo V. Antinutritional effects of Fumonisin B1 and pathophysiological consequences. *Toxicology Letters* 2003; 140-141:459-63.
4. Unione Europea. Regolamento della Commissione Europea del 28 settembre 2007 n. 1126. Livelli massimi dei contaminanti nei generi alimentari. *GUCE* L255, 29 settembre 2007.
5. Galaverna G, Dall'Asta C, Mangia M, Dossena A, Marchelli R. Masked mycotoxins: an emerging issue for food safety. *Czech Journal of Food Science* 2009;27:S89-S92.

6. Kim E-K, Scott PM, Lau B P-Y. Hidden Fumonisins in corn flakes. *Food Additives and Contaminants* 2003;20(2):161-9.
7. Shier WT. The Fumonisin paradox: a review of research on oral bioavailability of Fumonisin B1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*. *Journal of Toxicology-Toxin reviews* 2000;19(2):161-87.
8. Oomen AG, Rompelberg CJM, Bruil MA, Dobbe CJG, Pereboom DPKH, Sips AJAM. Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archive of Enviromental and Contaminant Toxicology* 2003;44:281-7.
9. Versantvoort CHM., Oomen AG, Van de Kamp E, Rompelberg CJM, Sips AJAM. Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology* 2005;43:31-40.
10. Dall'Asta C, Mangia M, Berthiller F, Molinelli A, Sulyok M, Schuhmacher R, Krska R, Galaverna G, Dossena A, Marchelli R. Difficulties in Fumonisin determination: the issue of hidden Fumonisins. *Analitical and Bioanalitical Chemistry* 2009;395:1335-45.

DEOSSINIVALENOLO, ZEARALENONE E LORO METABOLITI NELLA FILIERA DEI CEREALI

Claudia Falavigna, Chiara Dall'Asta, Gianni Galaverna, Arnaldo Dossena, Rosangela Marchelli
Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi, Parma

Introduzione

I Tricoteceni sono una famiglia di sesquiterpeni ciclici prodotti dai funghi del genere *Fusarium* quali metaboliti secondari tossici, classificati in 4 gruppi (A-D) a seconda delle caratteristiche dei loro gruppi funzionali. Tra questi, quelli appartenenti ai tipi A e B rappresentano i contaminanti principali delle derrate alimentari (1). La differenza tra i due gruppi è data dalla presenza di una funzione carbonilica in posizione C8 nei Tricoteceni di tipo B, mancante invece nella struttura di quelli di tipo A (2). Invece, il gruppo funzionale comune a questi composti è rappresentato da un epossido in posizione C12-C13, responsabile dell'attività tossicologica che si esplica sia a livello acuto che cronico, come conseguenza dell'inibizione dell'attività dell'enzima peptidil-transferasi (3). Sulla base dei dati epidemiologici la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) ha inserito tali tossine nella classe 2B (possibili cancerogeni per l'uomo). Al tipo A appartengono le Tossine T-2, HT-2 e Diacetossiscirpenolo (DAS), mentre nel tipo B rientrano Nivalenolo (NIV), Deossinivalenolo (DON) e le sue forme acetilate (3-acetil-DON e 15-acetil-DON). Tra questi composti, il DON (o Vomitossina) rappresenta il contaminante più diffuso nei cereali (4). Le stesse specie di *Fusarium* produttori di Tricoteceni (*F. culmorum* e *F. graminearum*) sono responsabili anche della produzione di Zearalenone (ZEA), che spesso si trova quale co-contaminante assieme al DON e i cui effetti di tossicità cronica sono legati alla sua somiglianza strutturale con l'Estradiolo, che ne determina la capacità di legarsi ai recettori degli estrogeni. Pertanto, lo ZEA è classificato come micoestrogeno (5). L'Unione Europea, con il Reg. CE 1881/2006, ha fissato i livelli massimi di DON e ZEA accettabili sia nelle materie prime che nei prodotti finiti destinati all'alimentazione umana: 1750 µg/kg di DON e 100 µg/kg di ZEA per grano duro non processato, 750 µg/kg di DON e 75 µg/kg di ZEA per i cereali adibiti ad uso umano, 500 µg/kg di DON e 50 µg/kg di ZEA per i prodotti finiti (6). Negli ultimi anni è emerso chiaramente che nelle materie prime e nei prodotti alimentari contaminati da micotossine possono essere presenti, oltre alle forme native, diversi composti correlati generati dal metabolismo della pianta o formatisi durante i trattamenti tecnologici, noti come micotossine nascoste o mascherate. Nel caso specifico di Tricoteceni e ZEA, le forme nascoste sono rappresentate dai relativi derivati glicosilati, composti nei quali la tossina è legata ad una molecola più polare, allo scopo di essere stoccata nel vacuolo della pianta (7). Deossinivalenolo -3-O-glucoside (D3G) e Zearalenone-4-O-glucoside (Z4G) sono stati ritrovati in campioni naturalmente contaminati da *F. graminearum.* Analizzando campioni di frumento naturalmente contaminato e artificialmente inoculato con ceppi di *Fusarium* è stata rilevata una concentrazione di D3G pari al 30% di quella del suo precursore (8, 9). Le strutture chimiche dei derivati glicosilati di DON e ZEA sono mostrate in Figura 1.

DON-3-O-glucoside **ZEA-4-O-glucoside**
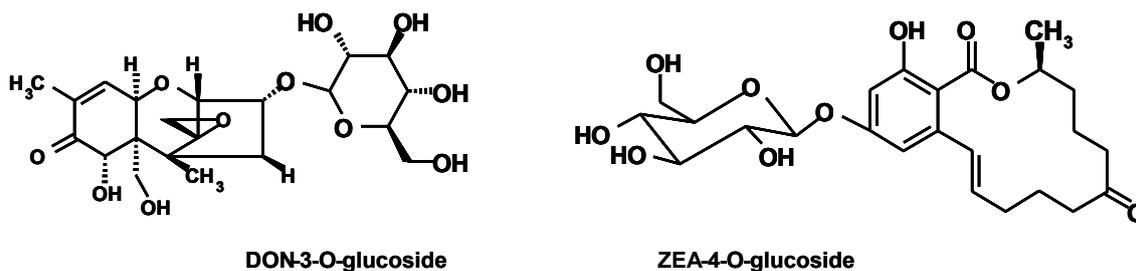
Figura 1. Strutture chimiche dei principali metaboliti glicosilati di DON e ZEA

Questi derivati hanno caratteristiche chimiche piuttosto diverse da quelle delle forme libere, pertanto non sono rivelabili con le metodiche di analisi di routine, ma possono comunque contribuire alla tossicità globale come tali o dopo idrolisi durante i trattamenti tecnologici o i processi di digestione, liberando i rispettivi agliconi e causando nel consumatore un'esposizione effettiva maggiore rispetto a quella stimata mediante le metodiche analitiche comunemente impiegate (8).

In questo lavoro si è scelto di prendere in considerazione la maltazione del frumento, al fine di valutare la possibile variazione dei livelli di contaminazione da Tricoteceni e ZEA per effetto delle modificazioni di natura enzimatica delle cariossidi. Durante la fase di germinazione, infatti, viene attivato il complesso enzimatico noto come diastasi (nel quale rientrano enzimi come α- e β-amilasi, fosforilasi e α-glucosidasi), assieme a proteasi, cellulasi, xilobiasi e β-glucanasi. Si ottiene, di conseguenza, l'idrolisi delle macrocomponenti del seme, in particolare di amido e proteine, con la probabile liberazione delle forme nascoste associate ai costituenti della matrice.

Materiali e metodi

Reagenti

Le soluzioni standard di Tricoteceni in miscela (NIV, DON, 3-Ac-DON e 15-Ac-DON, 101,7 µg/mL), Deossinivalenolo -3-glucoside (49,9 µg/mL), Deossinivalenolo isotopico al 98% (25 µg/mL), tutte in acetonitrile, sono state fornite da Biopure (Tulln, Austria). Lo standard di ZEA (10 mg) è stato fornito da Sigma (Stoccarda, Germania). Lo standard di Zearalenone glucoside (131 µg) è stato sintetizzato nel nostro laboratorio (10). Il metanolo utilizzato per le analisi HPLC (*High Perfomance Liquid Chromatography*) è stato ottenuto da Carlo Erba (Milano, Italia), mentre l'acetonitrile, sempre ad uso HPLC, è stato fornito da J.T. Baker (Mallinckrodt Backer, Phillipsburg, NJ, USA). L'acqua bidistillata è stata prodotta in laboratorio, utilizzando un sistema Alpha-Q-System (Millipore, Marlborough, MA, USA). La matrice certificata FAPAS impiegata per i Tricoteceni è una farina di frumento contaminata con 1062 ± 110 µg/kg di DON; la matrice certificata FAPAS per lo ZEA è una farina di mais contaminata con 60 ± 9 µg/kg di ZEA.

Campioni di frumento

I campioni di frumento (artificialmente inoculato con ceppi di *Fusarium*) maltato e non maltato sono stati forniti dall'Istituto Sperimentale Cerealicolo di Fiorenzuola (Piacenza, Italia).

Maltazione di grano duro

50-60 g di cariossidi pulite e setacciate sono state immerse in acqua potabile per 48 ore, quindi sono state stese su carta assorbente e lasciate germinare per 10 giorni a temperatura ambiente. Dopo allungamento delle radichette poco oltre la lunghezza del seme, si è proceduto all'essiccazione in forno a ventilazione forzata a 75°C per 40 ore.

Preparazione dei campioni

10 g di campione di frumento macinato vengono estratti con una miscela estraente composta da acqua/acetonitrile (20:80 v/v) e omogeneizzati per 3 minuti a 6000 rpm. Dopo filtrazione su filtro a pieghe 5 mL dell'estratto vengono sottoposti a *clean-up* tramite colonnine Mycosep 227 Trich+ Multifunctional Columns, per Tricoteceni, o Mycosep 226 AflaZon+ Multifunctional Columns, per ZEA (RomerLabs). 2 mL di estratto purificato vengono quindi portati a secco sotto flusso di N_2 e il residuo viene ripreso con 500 µL di metanolo, prima dell'analisi in LC-ESI-MS/MS (*Liquid Chromatography-Electron Spray Ionization Tandem Mass Spectrometry*).

Analisi LC-ESI-MS/MS

Le analisi LC-ESI-MS/MS sono state effettuate utilizzando un HPLC Alliance 2695 (Waters Co., Milford, MA, USA), accoppiato con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo Quattro Micro^{TM} API con sorgente Electrospray (Micromass, Waters, Manchester, UK).

Le condizioni cromatografiche impiegate sono le seguenti: colonna Phenomenex Synergi 2,5 µm Fusion-RP 100Å (50 x 2.00 mm), dotata di precolonna C18; flusso, 0,25 mL/min; temperatura della colonna, 30°C; volume di iniezione, 5 µL; il gradiente di eluizione è stato ottenuto utilizzando acqua acidificata allo 0,01% con acido acetico (eluente A) e metanolo (eluente B): condizioni iniziali al 95% di A, 0-9 minuti al 70% di B, 9-20 minuti in condizioni isocratiche, 21 minuti al 95% di A, 21-30 minuti ricondizionamento al 95% di A (tempo totale di analisi: 30 minuti).

Le impostazioni per le analisi spettrometriche sono state le seguenti: ESI- (modalità di ionizzazione negativa); voltaggio del capillare, 2,5 kV; cono, 10 V per i Tricoteceni e ZEA-4-glucoside, 60 kV per ZEA; estrattore, 3V; temperatura della sorgente, 150°C; temperatura di desolvatazione, 350°C; flusso del gas del cono e del gas di desolvatazione (azoto), 50 L/h e 500 L/h, rispettivamente.

La rivelazione è stata effettuata utilizzando la modalità operativa *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), messa a punto sull'addotto acetato di ogni micotossina, monitorando tre transizioni per ogni analita.

Le transizioni monitorate, le relative energie di collisione e le finestre di acquisizione sono riassunte in Tabella 1.

Tabella 1. Finestre di acquisizione, transizioni monitorate e relative energie di collisione impiegate per ogni analita

Analita	Finestra di acquisizione (min)	Transizione monitorata (m/z)	Energie di collisione (eV)
NIV	3,00-5,00	371,30 > 311,20	12,0
		371,30 > 281,20	15,0
		371,30 > 58,50	15,0
^{13}C-DON (standard interno)	5,00-8,00	370,13 > 310,13	12,0
		370,13 > 279,10	15,0
		370,13 > 58,60	15,0
DON	5,00-8,00	355,00 > 295,20	12,0
		355,00 > 265,10	15,0
		355,00 > 58.90	15,0
DON-3-glucoside	6,00-8,50	517,10 > 457,10	20,0
		517,10 > 427,10	20,0
		517,10 > 59,10	55,0
3-Acetil-DON, 15-Acetil-DON	7,00-11,00	397,10 > 337,10	12,0
		397,10 > 307,10	15,0
		397,10 > 58,60	15,0
ZEA-4-glucoside	10,00-12,00	479,13 > 317,15	15,0
ZEA	11,00-15,00	317,10 > 187,10	27,0
		317,10 > 175,20	27,0
		317,10 > 131,33	27,0

Risultati e discussione

Confronto tra campioni maltati e non maltati

Allo scopo di valutare l'influenza del processo di maltazione sulla stabilità delle micotossine in esame e sull'evoluzione del grado e del tipo di contaminazione, con la possibile formazione dei coniugati glicosilati o la liberazione delle forme nascoste associate ai macrocomponenti, è stato analizzato un set di campioni di frumento maltato, fornito dall'Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura di Fiorenzuola (Piacenza, Italia).

I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli conseguiti analizzando la corrispondente materia prima, non ancora sottoposta a maltazione.

Ogni campione è stato analizzato in doppio e le concentrazioni degli analiti sono state quantificate sulla base di rette di taratura costruite in matrice e corrette per i fattori di recupero, comprensivi della fase di estrazione e *clean-up* su Mycosep, calcolati per ZEA e DON in 92% e 72%, rispettivamente.

Dall'analisi dei campioni, nella maggior parte dei casi è stata osservata una drastica diminuzione dei livelli di DON, come mostrato in Figura 2.

Tale riduzione può essere imputata sicuramente ad una parziale solubilizzazione della micotossina nelle acque di imbibizione ma anche alla sua trasformazione in metaboliti non rivelabili mediante la metodica di estrazione e analisi impiegata nel presente lavoro.
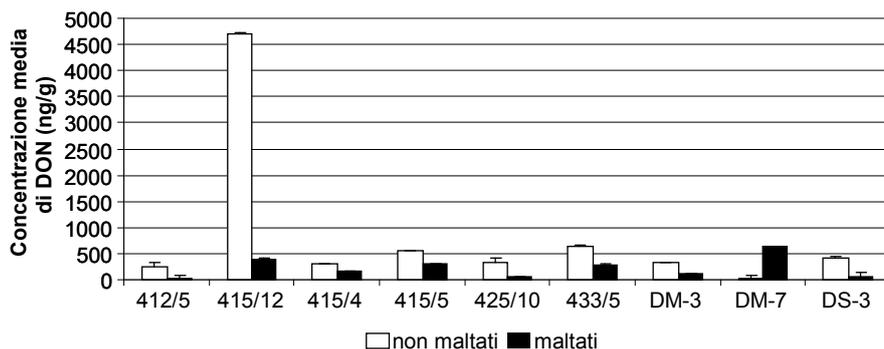
Figura 2. Variazione dei livelli di DON in seguito a maltazione

Parallelamente alla diminuzione di DON, nel caso dello ZEA è stata riscontrata la tendenza opposta, ovvero un significativo incremento del grado di contaminazione durante la maltazione, dovuto molto probabilmente alla rottura delle interazioni tra la tossina e le macrocomponenti a cui si trova legata nella materia prima ad opera dell'azione degli enzimi idrolitici attivati nel corso della germinazione. In Figura 3 è mostrata la differenza tra la concentrazione di ZEA rivelata prima e dopo il processo in esame.
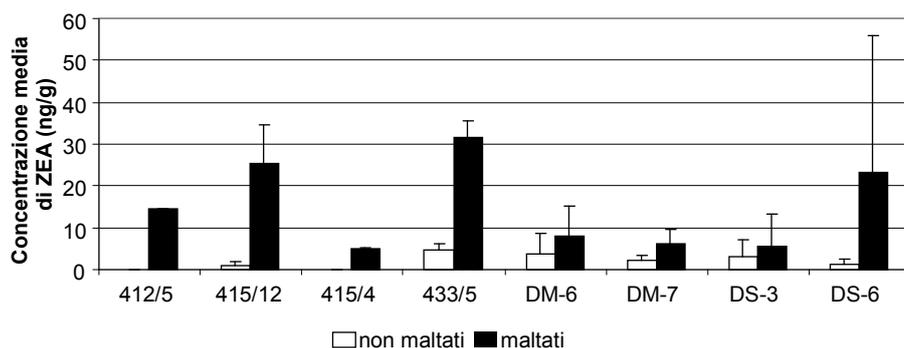
Figura 3. Variazione dei livelli di ZEA in seguito a maltazione

Maltazione di grano duro naturalmente contaminato

Nella seconda fase dello studio è stata effettuata la maltazione su una serie di campioni di frumento naturalmente contaminato da ceppi di *Fusarium* produttori di Tricoteceni, sui quali un primo screening ha permesso di rivelare una discreta contaminazione da DON. La produzione del malto è stata eseguita cercando di simulare su piccola scala le tre fasi principali che compongono il processo che porta all'ottenimento del "malto base": immersione delle cariossidi in acqua, successiva germinazione su una superficie asciutta e asciugatura finale in forno essiccatore a ventilazione forzata, come precedentemente descritto. La successiva analisi dei campioni ha permesso, per quanto concerne il DON, di confermare la tendenza emersa

precedentemente: nei campioni maltati sono stati riscontrati livelli di DON sensibilmente inferiori a quelli trovati nei corrispettivi non maltati, come mostrato in Figura 4.
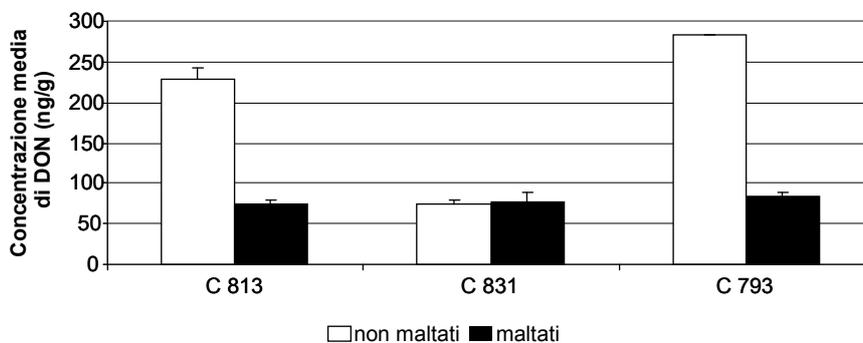
Figura 4. Variazione dei livelli di DON in seguito a maltazione di campioni naturalmente contaminati

Nei campioni maltati è stato inoltre possibile osservare un incremento delle forme acetilate del DON: 3-Acetil-DON e 15-Acetil-DON, come riportato in Figura 5.
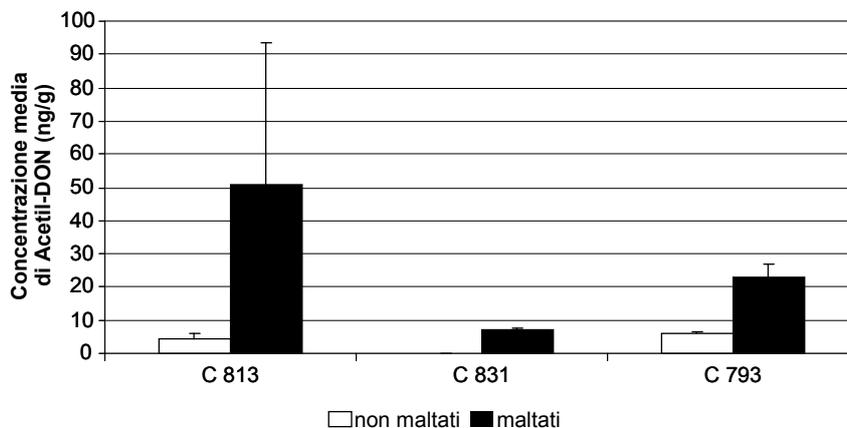
Figura 5. Variazione dei livelli delle forme acetilate del DON in seguito a maltazione di campioni di frumento naturalmente contaminato

In questo caso, i due fenomeni possono essere correlati dall'ipotesi per la quale le forme acetilate derivino dalla conversione enzimatica del loro precursore, sempre ad opera di enzimi che vengono ad attivarsi nel corso della maltazione.

Conclusioni

Dall'analisi di campioni di frumento maltato e della corrispondente materia prima non maltata emerge una forte diminuizione della contaminazione da DON e, parallelamente, un significativo incremento delle forme acetilate del DON o di ZEA, durante il processo. Questo lascia supporre che gli enzimi che vengono ad attivarsi possano, da un lato, trasformare la micotossina nei suoi derivati o in metaboliti non rivelabili mentre, nel caso dello ZEA, questi riescano a distruggere le interazioni tra l'analita e i componenti della matrice ai quali questo si trova associato. Dai risultati ottenuti non ci è dato sapere quali siano gli enzimi principalmente coinvolti nella metabolizzazione delle micotossine libere o delle loro forme nascoste e, pertanto, non si è in grado di capire con certezza quali siano le macrocomponenti delle cariossidi che interagiscono con le micotossine e il tipo di interazione. La principale conclusione che da qui emerge, tuttavia, è la conferma dell'esistenza di derivati mascherati non rivelabili con le tecniche analitiche comunemente impiegate che costituiscono una problematica in prodotti alimentari finiti e semilavorati nei quali il processo produttivo può portare alla liberazione delle micotossine.

Bibliografia

1. Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxyns on humans and animals; *Toxicology* 2001;167:101-34.
2. Krska R, Welzig E, Boudra H. Analysis of Fusarium toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology* 2007;137:241-64.
3. Sudakin DL. Trichothecenes in the enviroment: relevance to human health. *Toxicology Letters* 2003;143:97-107.
4. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 2003;497-516.
5. FAO. *Mycotoxins of growing interest. Zearalenone.Proceedings of the Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins*; Tunis, Tunisia, 3-6 March 1999. (MYC-CONF/99/5d) 1999.
6. Unione Europea. Regolamento della Commissione Europea del 28 settembre 2007 n. 1126. Livelli massimi dei contaminanti nei generi alimentari. *GUCE* L255, 29 settembre 2007.
7. Zhou B, Li Y, Gillespie J, He G, Horsley R, Schwarz P. Matrix design for optimization of the determination of bound deoxynivalenol in barley grain with trifluoroacetic acid (TFA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007;55:10141-9.
8. Berthiller F, Dall'Asta C, Schuhmacher R, Lemmens M, Adam G, Krska R. Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53:3421-5.
9. Liu Y, Walker F, Hoeglinger B, Buchenauer H. solvolysis procedures for the determination of bound residues of the mycotoxin deoxynivalenol in fusarium species infected grain of two winter wheat cultivars preinfected with barley yellow dwarf virus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;53:6864-9.
10. Falavigna C. *Analisi multiresiduale di Tricoteceni e Zearalenone in frumento.* Tesi di Laurea Specialistica AA 2007-2008, Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Parma.

INFLUENZA DEL SUOLO SULLA PRODUZIONE DI OCRATOSSINA A LUNGO LA FILIERA VITIVINICOLA

Nicola Gebbia, Maria Monte, Gioacchino Aiello, Alessio Calderone, Francesco Cannizzaro, Alice Curione, Aurelia Lo Giudice, Maria Montalbano, Francesca Oliveri, Lucia Crosta
Co.Ri.Bi.A. - Consorzio di Ricerca sul Rischio Biologico in Agricoltura, Palermo

Introduzione

Nella filiera vitivinicola i generi responsabili della produzione di Ocratossina A (OTA) sono *Aspergillus e Penicillium*. Tra il genere *Aspergillus,* la specie *A. carbonarius* è il principale agente di contaminazione da OTA al sud e nelle isole, dove le condizioni pedo-climatiche ne favoriscono lo sviluppo.

In tema di sicurezza alimentare l'analisi di prodotti per la rilevazione di contaminanti è una pratica di importanza cruciale per garantire la sicurezza e la qualità degli stessi.

In letteratura sono riportati gli effetti negativi dell'OTA sulla salute umana, quali l'azione nefrotossica, epatotossica, teratogena, e immunodepressiva (1). A conferma di ciò, alcuni dati tossicologici, derivati da studi condotti su animali, hanno dimostrato che vi è correlazione fra la presenza di micotossine e l'insorgenza di alcune forme tumorali e/o di altre patologie altrettanto gravi (2). Dalla IARC (*International Agency for Research on Cancer*), suddetta tossina è stata inserita nel gruppo 2B cioè "possibile agente cancerogeno per l'uomo" (3). La dose giornaliera tollerabile è estremamente bassa: quella massima giornaliera è ritenuta di 0,1 µg/kg di peso corporeo. A tal proposito l'Unione Europea ha provveduto, mediante il Reg. CE 1881/2006, a stabilirne il tenore massimo assimilabile in 2 µg/L per il vino, il mosto e le bevande a base di succo d'uva. A tal proposito è opportuno effettuare analisi mirate a prevenirne la causa, già a partire dal pieno campo e nel caso specifico riferito al settore enologico, dal vigneto. Le analisi, estese a tutta la filiera vitivinicola, permettono di correlare non solo gli aspetti prettamente enologici, ma anche tutti i principali fattori responsabili di eventuali contaminazioni, come quelli pedoclimatici, ambientali e tecnico-agronomici.

L'obiettivo della ricerca è quello di studiare gli effetti del terreno sulla resistenza/sensibilità della vite all'attacco del fungo ocratissigeno *Aspergillus carbonarius*, sulla produzione di OTA. Pochi sono i dati sperimentali sull'effetto del suolo, alcune ricerche, ancora in fase preliminare (4), hanno dimostrato come il suolo calcareo sia in grado di indurre, assieme a gravi sintomi di clorosi fogliare, un maggiore accumulo di OTA nell'uva rispetto ad un suolo neutro. Sono note, invece, le interazioni dell'ambiente sul genotipo e come, a parità di genotipo, l'espressione dei risultati quali-quantitativi possa essere influenzata dallo stesso.

Materiali e metodi

La seguente ricerca è stata condotta su due siti sperimentali Tesi A - Contrada Casale, Marsala (TP) e Tesi B - Contrada Biesina, Marsala (TP), distinti per condizioni pedologiche, nello specifico per il diverso contenuto calcareo del suolo. La cultivar a bacca rossa "Nero d'Avola" innestata sullo stesso portinnesto (140 Ru), è stata individuata per la prova perché

ampiamente diffusa in Sicilia. Il microclima dei due ambienti è stato caratterizzato recependo i dati dalle stazioni del servizio agrometereologico della Regione Sicilia (SIAS).

Il campionamento del suolo, mediante carotaggio, è stato utilizzato per rilevare le caratteristiche chimico-fisiche del terreno. Sulle piante, sono stati valutati visivamente i sintomi clorotici e sulle foglie sono state effettuate le analisi chimiche per determinare le diverse concentrazioni di elementi minerali (Metodo ufficiale 985.01 - AOAC *official Method* "*Metals and other elements in plants*"). Sulle piante non clorotiche, per annullare l'effetto della luce, manualmente si è proceduto alla creazione di uguali livelli di esposizione dei grappoli; a tal fine sono stati effettuati rilievi di caratterizzazione della chioma (Tabella 1) attraverso il metodo dei contatti o del *Point Quadrat* (5).

Tabella 1. Percentuale di foglie, grappoli esterni e percentuale di vuoti. Rilievi effettuati con il metodo del *Point Quadrat*

Parametro	Valore rilevato
Foglie esterne (%)	55,7
Foglie interne (%)	53,2
Vuoti (%)	6,7
Altezza vegetazione (cm)	95
Spessore chioma (cm)	50
Grappoli esposti (%)	40,9

Il campionamento dei grappoli, distinto per tesi, è stato condotto a partire dall'invaiatura in maniera casuale su tutto il vigneto. Alla raccolta sono state effettuate le micro-vinificazioni su cento chilogrammi di uva per replica e ciascun campione di mosto e vino, è stato destinato, insieme ai campioni di uva, all'indagine quali-quantitativa dell'eventuale contenuto di OTA e a quella microbiologica volta all'isolamento dei miceti presenti e all'identificazione molecolare di *A. carbonarius*. Inoltre, nelle bacche e nel vino sono stati determinati gli stilbeni (*trans*-resveratrolo, piceatannolo, glicoside *trans*-resveratrolo, astringina, *cis*-resveratrolo, glicoside *cis*-resveratrolo, pterostilbene, 3'idrossipterostilbene) e i flavonoidi (quercetina, kaempferolo) tramite analisi HPLC (*High Perfomance Liquid Chromatography*) con rivelatore DAD (*Diode Array Detector*).

Determinazione di OTA

La determinazione del contenuto di OTA è stata effettuata mediante strumentazione HPLC utilizzando un adattamento del metodo *Automated HPLC method for the determination of Ochratoxin A in samples wine* (6).

L'estratto ottenuto dai campioni di uve è stato dapprima purificato mediante colonnine di immuno-affinità (Ochraprep), quindi iniettato in sistema HPLC che sfrutta una colonna a fase inversa Symmetry C18 termostatata a 38°C e utilizza come eluente una miscela acetonitrile/acqua/acido acetico (50:49:1 in volumi). L'OTA è rivelata mediante spettrofluorimetro settato alle lunghezze d'onda di 333 nm (eccitazione) e di 460 nm (emissione).

L'identificazione del picco cromatografico è avvenuta iniettando una soluzione standard di OTA a concentrazione di 1 ng/mL e registrando il tempo di ritenzione.

La retta di taratura è stata costruita tramite sette standard a concentrazione crescente di OTA, con un intervallo di concentrazione che varia da 0,02 a 2,5 ng/mL e con un coefficiente di correlazione maggiore di 0,99.

Isolamento di *Aspergillus carbonarius*

L'isolamento del micete, sia da grappoli che da mosto, è stata eseguita utilizzando terreni solidi agarizzati di cui uno semiselettivo, ossia il MEA (*Malt Extract Agar*) contenente antibiotici (cloramfenicolo e clorotetraciclina) e l'altro MEA-B (*Malt Extract Boscalid Agar*) reso selettivo per l'aggiunta del fungicida Boscalid alla concentrazione di 5 mg/L (Cantus) che inibisce la crescita delle specie appartenenti al genere *Aspergillus* ma favorisce lo sviluppo di *A. carbonarius* (7). La lettura delle piastre, poste in incubazione a 25°C, è stata effettuata dopo circa 3 giorni.

Identificazione molecolare di *Aspergillus carbonarius*

Le indagini molecolari hanno previsto una prima fase di estrazione del DNA dai campioni di mosto e dalle piastre dove sono cresciute le colonie. Queste, ad un esame macroscopico hanno mostrato le tipiche caratteristiche del micelio di *Aspergillus*. Successivamente è stata applicata la tecnica di PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Per l'estrazione del DNA, il protocollo si è basato sull'applicazione di un kit commerciale che unisce l'efficacia della cromatografia con la velocità della centrifugazione. Il kit utilizza colonnine che sfruttano il principio di affinità del DNA ad una membrana di silice che lo cattura e successivamente viene eluito mediante un opportuno buffer.

Dopo avere estratto il DNA si è proceduto con l'amplificazione. Il *target* scelto è un frammento interno al dominio AT del gene PKS che codifica per l'enzima polichetido sintetasi di *A. carbonarius*. È stata quindi messa a punto una PCR tradizionale (*End Point PCR*), tramite il termociclatore 2720 (Applied Biosystems), utilizzando una coppia di *primer* (OTA-F/OTA-R), che generano un prodotto di amplificazione di 141bp (4). Gli amplificati sono stati separati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio alla concentrazione del 2%, visualizzati al transilluminatore e mediante apposito software è stata acquisita la foto. È stato considerato positivo il campione in cui il prodotto di amplificazione è lungo 141bp. Come controllo positivo interno, è stato usato un campione di DNA estratto da un ceppo di riferimento di *A. carbonarious* (NRRL67).

Risultati

Dall'analisi del terreno è emerso che il suolo di C/da Casale (Tesi A) presenta un contenuto di calcare attivo pari a 117 g/kg, maggiore rispetto a quello riscontrato per il Campo Biesina (Tesi B) dove risulta pari a 25 g/kg. Si conferma, quindi con il dato analitico, la presenza dell'ingiallimento fogliare dovuto a sintomi da clorosi.

I risultati dell'analisi fogliare (Tabella 2) fanno emergere che il contenuto di ferro presente nelle foglie prelevate dal vigneto insistente sul Campo Biesina (Tesi B) è superiore rispetto a quello caratterizzato da suolo con un contenuto di calcare attivo superiore Campo Casale (TESI A).

Tabella 2. Contenuto di ferro nelle foglie di vite cv "Nero d'Avola" allevata su due suoli a diverso contenuto di calcare attivo (Tesi A e B)

Prelievo	Tesi	Contenuto in ferro (mg/kg di peso secco fogliare)	RDS (%)
Primo	A	460,30 ± 0,9	1,9
	B	639,80 ± 2,0	4,5
Secondo	A	492,75 ± 1,0	2,4
	B	704,23 ± 0,5	1,0

Isolamento e identificazione molecolare di *Aspergillus carbonarius*

La diversa tipologia dei terreni (MEA e MEAB) scelti per l'isolamento ha confermato la selettività del terreno MEAB per *A. carbonarius;* infatti, solo da due campioni di acini (1-2) è stato possibile isolare il micete su questo terreno, la cui positività è stata successivamente confermata dalla PCR specie-specifica sul DNA estratto dal corrispettivo micelio. Sono considerate positive quelle colture, in cui si è registrato lo sviluppo di conidi di *A. carbonarius*, i cui ceppi sono caratterizzati da testa conidiofora nera biseriata con conidi grandi globosi e rugosi, difficilmente distinguibili dalle specie di *A. niger*, caratterizzata da testa conidiofora nera-marrone con conidi molto più piccoli rispetto ad *A. carbonarius* e di forma variabile. L'isolamento, su terreno MEA, di miceti provenienti dagli altri campioni, evidenzia come sia sicuramente presente una flora funginea contaminante, ma non appartenente alla specie *A. carbonarius*, come dimostra la negatività della PCR specie-specifica. L'analisi molecolare è stata eseguita sia su DNA estratto dai miceli cresciuti in piastre, che su quello estratto da bacche d'uva. Su 6 campioni di acini, 4 sono risultati positivi alla PCR, anche se su due campioni (3-4), non c'è stato alcun isolamento del micete. I due campioni di mosto (7- 8) (Figura 1) e i due campioni di vino (9-10) sono risultati positivi alla PCR per *A. carbonarius*, ma non è stato possibile isolare il micete.
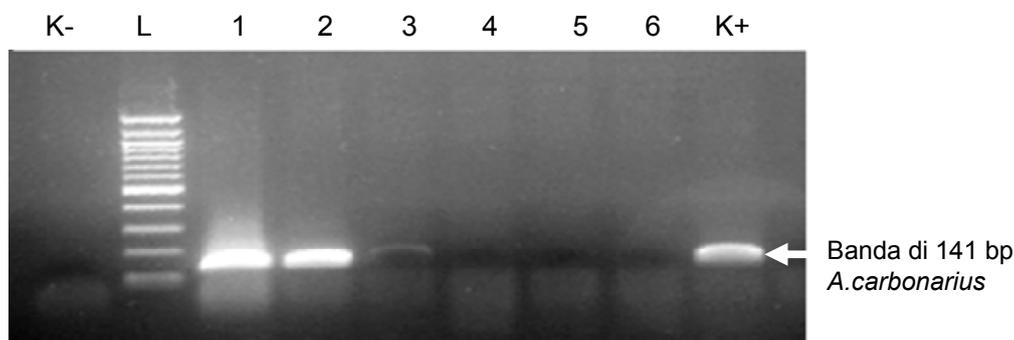
Figura 1. Corsa elettroforetica su gel di agarosio dei prodotti di PCR dei due campioni di mosto

I risultati dimostrano come l'analisi molecolare, PCR specie-specifica, risulti una tecnica che, per la sua elevata sensibilità e specificità, permette di rilevare piccole tracce del micete anche quando non è possibile isolarlo su piastra perché non vitale; inoltre per la sua velocità di esecuzione permette una rapida identificazione di *A. carbonarius*, fornendo indicazioni utili alla

gestione del vigneto. In Tabella 3 vengono riportati i risultati per ciascun campione, relativamente sia all'isolamento su piastra che alla identificazione molecolare (PCR) di *A. carbonarius*.

Tabella 3. Risultati ottenuti dall'isolamento e dall'analisi molecolare di *A.carbonarius*

Epoca di campionamento	Campione	Tesi	Matrice	PCR specie-specifica da matrice	Isolamento		PCR specie-specifica da colonie
					Mea	MEAB	
Inizio invaiatura	1	A	Acini	POS	POS	POS	POS
	2	B	Acini	POS	POS	POS	POS
Intermedio di maturazione	3	A	Acini	POS	POS	NEG	NEG
	4	B	Acini	POS	NEG	NEG	NEG
Raccolta	5	A	Acini	NEG	POS	NEG	NEG
	6	B	Acini	NEG	POS	NEG	NEG
Prodotto lavorato	7	A	Mosto	POS	NEG	NEG	NEG
	8	B	Mosto	POS	NEG	NEG	NEG
	9	A	Vino non filtrato	POS			
	10	B	Vino non filtrato	POS			

I campioni di uva e di mosto, distinto per tesi, sono stati destinati all'indagine quantitativa del contenuto di OTA e a quella molecolare, volta all'identificazione dell'*Aspergillus carbonarius*. Dalle analisi effettuate sulle uve si evince che la concentrazione di OTA risulta maggiore nelle uve provenienti dal vigneto con una dotazione di calcare del suolo superiore (Tabella 4).

Tabella 4. Contenuto di OTA nelle uve

Campione	Tesi	Epoca campionamento UVE	Contenuto di OTA (μg/kg)
1 - 2	A e B	Inizio Invaiatura	< LOQ*
3 - 4	A e B	Intermedio di maturazione	< LOQ
5	A	Raccolta	0,14 ± 0,04
6	B		0,06 ± 0,01

*LOQ = *Limit of Quantification* = 0,05 μg/kg

I risultati sul mosto prima e sul vino dopo, hanno evidenziato la presenza di OTA in concentrazioni al di sotto del limite di legge (2 ng/g), non rilevando alcuna differenza statisticamente significativa nelle due tesi (Tabella 5).

Tabella 5. Contenuto di OTA nel prodotto delle micro-vinificazioni

Campione vinificato	Tesi	Contenuto di OTA (μg/L)
7	A	0,28±0,08
8	B	0,29±0,04
9	A	0,12±0,02
10	B	0,16±0,01

Discussioni e conclusioni

Dai dati emerge che esiste una correlazione positiva alla contaminazione funginea e il contenuto di calcare attivo sul suolo nell'uva, principale causa di stress abiotico sulla pianta, nonché di sintesi di *Aspergillus* (8).

Le osservazioni eseguite in campo hanno rilevato che le foglie, prelevate da viti allevate in condizioni pedologiche caratterizzate da un maggiore contenuto di calcare attivo, mostrano in maniera più marcata uno stato evidente di ingiallimento internervale. Parimenti le osservazioni sulle bacche, hanno messo in evidenza i sintomi di un avvenuto attacco fungineo. Tale comportamento è emerso anche dal risultato ottenuto con l'analisi molecolare tramite tecnica PCR che ha portato all'identificazione molecolare del DNA equivalente a quello *di A. carbonarius.*

I campioni analizzati per il contenuto di OTA hanno riportato valori al di sotto dei limiti di legge (Reg. CE 1881/2006). Ciò presumibilmente è da imputare alla buona conduzione e gestione dei vigneti in osservazione, alle pratiche agronomiche e ai trattamenti chimici effettuati che hanno ridimensionato la contaminazione funginea e il livello di OTA nelle uve e nel vino. Quest'ultimo è stato ottenuto da micro-vinificazione delle uve; si tratta pertanto di una quantità esigua di prodotto che per tale ragione è facilmente gestibile. Questo aspetto presumibilmente permette di contenere significativamente l'eventuale contaminazione di Ocratossina nella massa totale.

Bibliografia

1. Visconti A, Pascale M, Centonze G. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1999;864:89-101.
2. Berndt WO, Hayes AW. *In vivo* and *in vitro* changes in renal function caused by ochratoxin A in the rat. *Toxicology* 1979;12:5-17.
3. Ochratoxin A. In: *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 56 Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterociclyc aromatic amines and mycotoxin.* Lyon, France*:* International Agency for Research on Cancer; 1993. p. 489-521.
4. Bavaresco L, Vezzulli S, Civardi S, Gatti M, Pietri A, Ferrari F, Battilani P. Clorosi ferrica da calcare e risposta della vite all'attacco di Aspergillus carbonarius. In: *Atti del II Convegno Nazionale di Viticoltura.* Marsala, 14-19 luglio 2008. Firenze: SOI Edizioni; 2008.
5. Smart R, Robinson M. *Sunlight into wine: a handbook for winegrape canopy management*. Adelaide, AUS: Winetitles;1991.
6. Brera C, Grossi S, De Santis B, Miraglia M. Automated HPLC Method for the Determination of Ochratoxin A in Wine Samples*. Journal of Liquid Chromatography & related technologies* 2003;26:119-33.
7. Pollastro S, De Miccolis Angelini RM, Faretra F. A semi-selective medium for the ochratoxigenic fungus Aspergillus carbonarius. *Journal of plant pathology* 2006;88(1):107-12.
8. Atoui A, Mathieu F, Lebrihi A. Targeting a polyketide synthase gene for Aspergillus carbonarius quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* 2007;115:313-8.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Centro per l'Innovazione Viti-vinicola Ernesto Del Giudice di Marsala (TP) per la collaborazione tecnica offerta fornendo i vigneti sperimentali su cui è stata condotta la prova ed effettuando le micro-vinificazioni delle uve in studio.

FATTORI INFLUENTI SULLO SVILUPPO FUNGINO NELLA GRANELLA DI MAIS: EFFETTO DELLA TEMPERATURA SU UMIDITÀ E *WATER ACTIVITY* DURANTE LA MATURAZIONE

Andrea Maiorano, Mattia Ciro Mancini, Amedeo Reyneri
Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università degli Studi, Torino

Introduzione

Normalmente, durante la fase di campo, il parametro più comunemente utilizzato per descrivere la presenza di acqua nella granella è l'umidità. Questo parametro però non descrive sufficientemente la disponibilità di acqua ad esempio per lo sviluppo di funghi tossigeni: tale disponibilità è determinata dall'interazione tra le molecole d'acqua, la temperatura e le caratteristiche chimiche e fisiche del substrato (1). Si preferisce quindi utilizzare il parametro *water activity* (a_w) che è la misura dello stato energetico dell'acqua di un sistema (2). La relazione che lega l'umidità di un substrato e la a_w, a temperatura e pressione costanti, si chiama isoterma di sorbimento e dipende dalle caratteristiche del substrato (3). Gli obbiettivi di questo lavoro sono stati: i) osservare l'evoluzione del *dry-down* e dell'acqua libera durante il processo di maturazione in campo; ii) determinare le isoterme di sorbimento di granella di mais durante il suo sviluppo a 15, 25, 40°C; iii) determinare il miglior modello matematico per descrivere le tre isoterme di sorbimento.

Metodologia

Durante la campagna 2007, campioni di mais sono stati raccolti da due campi aziendali in Piemonte, seminati con l'ibrido PR34N43 (*Pioneer Hi-Bred*) nella terza decade di marzo. I campioni sono stati raccolti settimanalmente a partire dal 60% (±1%) di umidità della granella fino al 40% (±1%) e poi due volte alla settimana fino al 17% (±1%). Per ogni raccolta sono state prelevate tre ripetizioni da 10 spighe ciascuna, in tre diversi punti dei campi. I campioni sono stati sgranati, e la granella accuratamente miscelata. I campioni di granella sono stati quindi pesati e misurati per la determinazione della a_w (Aqualab® 3TE by Decagon Devices, range 0,030-1,000 a_w, accuratezza ±0,003 a_w, risoluzione ±0,001 a_w) entro 10-15 minuti dalla raccolta. I campioni sono stati poi essiccati in stufa ventilata a 103°C per 72 ore per la determinazione dell'umidità (*American Association of Cereal Chemists and American Society of Agricultural Engineers*).

Sei diversi modelli matematici trovati in letteratura sono stati parametrizzati attraverso regressione non lineare per descrivere le isoterme di sorbimento alle tre temperature e le loro performance son state valutate mettendo a confronto il coefficiente di determinazione R^2 e la deviazione percentuale media P(%) (4).

Risultati e discussione

L'evoluzione dell'umidità e della a_w nei due campi piemontesi hanno avuto andamento pressoché identico. In Figura 1, a titolo di esempio, è mostrato l'andamento di uno dei due campi. Conseguentemente, i dati dei due campi sono stati aggregati e analizzati insieme per lo studio delle isoterme, rappresentate in Figura 2. In Figura 2, seguendo la direzione del processo di maturazione (freccia nera), la a_w è costante (a_w = 1,000) fino ad un umidità intorno a 36%, successivamente inizia a decrescere. L'effetto della temperatura invece inizia ad essere evidente intorno al 34% di umidità, se si confrontano le isoterme a 15°C e 25°C, e intorno a 26%, se si confrontano le isoterme a 25°C e 40°C: in tutte e due i casi appare chiaro che a umidità costante, la a_w aumenta con la temperatura. Questi risultati indicano, come atteso, che all'aumentare della temperatura il mais diventa più igroscopico (4). Tra i sei modelli confrontati, il modello di Chung-Pfost è risultato essere il migliore (15°C: R^2=0,955, P%=1,340; 25°C: R^2=0,960, P%=0,775; 40°C: R^2=0,963, P%=0,457) per descrivere le isoterme alle tre temperature.
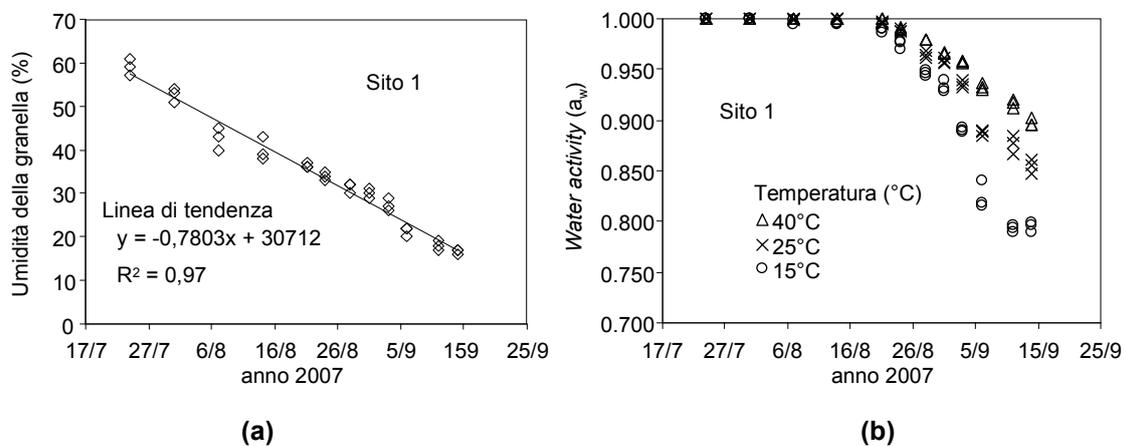
Figura 1. Evoluzione del contenuto di umidità (a) e della *water activity* misurata a 15, 25 e 40°C (b) durante la maturazione nel campo 1 della sperimentazione
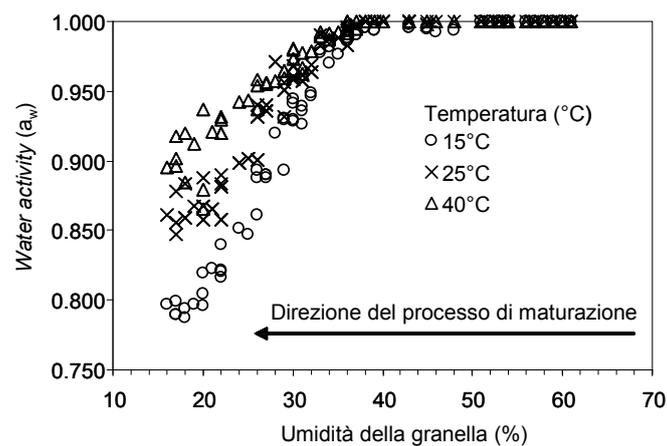
Figura 2. Isoterme di sorbimento a 15, 25, 40°C, per la granella di mais durante la maturazione

Gli altri modelli infatti hanno mostrato R^2 inferiori e P% maggiore, compreso il noto *GAB model*, già utilizzato per prodotti a base di mais (4, 5). Questa differenza è spiegabile prendendo in considerazione che questo è il primo lavoro in cui si calcolano le isoterme per granella di mais durante la maturazione e quindi con valori alti di umidità e acqua libera. Inoltre, per questo lavoro, prelevando granella di mais durante la maturazione e quindi alla sua naturale umidità, non c'è stata la necessità di effettuare una reidratazione per portare il substrato all'umidità desiderata, evitando quindi il problema dell'isteresi che ha caratterizzato i passati lavori sul tema.

Conclusioni

Questa ricerca ha messo in evidenza l'importante effetto della temperatura sul livello di a_w: più alta la temperatura, più alta la a_w a umidità costante. Il modello Chung-Pfost è risultato il più adeguato per descrivere le isoterme per la granella di mais durante la maturazione. Questi risultati possono essere utilizzati in modelli di simulazione di funghi tossigeni nella granella di mais, come il modello FUMAgrain, per il quale questa ricerca è stata pensata.

Bibliografia

1. Labuza TP, Altunakar B. Water activity prediction and moisure sorption isotherms. In: Barbosa-Canovas GV, Fontana AJJ, Schmidt SJ, Labuza TP (Ed.). *Water activity in foods - Fundamentals and applications.* Ames, Iowa (USA): IFT Press - Blackwell Publishing; 2007. p. 440.
2. Reid DS. Water activity: fundamentals and relationships In: Barbosa-Canovas GV, Fontana AJJ, Schmidt SJ, Labuza TP (Ed.). *Water activity in foods - Fundamentals and applications.* Ames, Iowa (USA): IFT Press - Blackwell Publishing; 2007.
3. Al-Muhtaseb AH, McMinn WAM, Magee TRA. Moisture sorption isotherm characteristics of food products: a review. *Food and Bioproducts Processing* 2002,80(2):118-28.
4. Samapundo S**,** Devlieghere F, De Meulenaer B, Atukwase A, Lambonid Y, Debevere JM. Sorption isotherms and isosteric heats of sorption of whole yellow dent corn. *Journal of Food Engineering* 2007,79(1):168-75.
5. Quirijns EJ, van Boxtel AJB, van Loon W KP, van Straten G. Sorption isotherms, GAB parameters and isosteric heat of sorption. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2005,85(11):1805-14.

CONTAMINAZIONE DA OCRATOSSINA A E TRICOTECENI DI BISCOTTI PRELEVATI AL DETTAGLIO

Amedeo Pietri (a), Terenzio Bertuzzi (a), Barbara Agosti (a), Gianluca Donadini (b)
(a) Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza
(b) AIDASA c/o Istituto di Entomologia e Patologia Vegetale, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

Introduzione

Nell'attuale situazione europea, i due principali rischi da micotossine per il frumento e derivati riguardano la presenza di Ocratossina A (OTA), prodotta principalmente da *Penicillium verrucosum* e da *Aspergillus ochraceus*, e di fusariotossine, quali i Tricoteceni (TCT), soprattutto di tipo B, prodotti da *Fusarium culmorum* e *Fusarium graminearum*. L'OTA è una micotossina cancerogena, teratogena e immunodepressiva, può provocare nefriti ed epatiti, ed è classificata dallo IARC (*International Agency for Research on Cancer*) nel gruppo 2B, cioè come possibile sostanza ad azione cancerogena nei confronti dell'uomo. Nella Unione Europea (UE) per l'OTA è stato fissato un limite di 3 µg/kg per i prodotti destinati al consumo, derivati dai cereali. I TCT hanno un elevato potere immunosoppressore; quello che riveste la maggior importanza per diffusione e quantità è il Deossinivalenolo (DON). Il DON è stato classificato dallo IARC nel gruppo 3, sostanza non cancerogena per l'uomo. Per il DON, nella UE è in vigore un limite di 500 µg/kg per prodotti da forno e i cereali da colazione. Nella presente ricerca è stato effettuato un monitoraggio sulla contaminazione da OTA e da alcuni TCT (DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON, Nivalenolo NIV, tossine HT-2 e T-2) di campioni di biscotti prelevati al dettaglio.

Materiali e metodi

Prelevamento campioni

Da aprile 2007 a marzo 2008 sono stati prelevati, con cadenza mensile, campioni di biscotti tipo frollini di 5 diverse marche italiane (A, B, C, D, E). Quattro di queste (A, B, C, D) sono aziende leader del mercato, mentre una (E) è presente solo in punti vendita Hard Discount. I campioni, del peso minimo di 500 g, sono stati macinati e conservati a -20°C fino al momento dell'analisi.

Analisi di OTA

L'OTA è stata estratta da 10 g di campione macinato, con 100 mL di miscela CH_3OH:soluzione acquosa di $NaHCO_3$ al 3% (50+50 v/v), agitando per 45 minuti (1). Dopo filtrazione su filtro a pieghe, 5 mL del filtrato sono stati diluiti a 50 mL con tampone fosfato 10 mM, pH=7,4 (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) e la soluzione è stata fatta passare su colonna di immunoaffinità. Effettuato un lavaggio con 5 mL di PBS, l'OTA è stata eluita in provetta graduata con 3 mL di CH_3CN. Dopo avere concentrato l'estratto sotto flusso di N_2, lo si è portato ad 1 mL con una miscela CH_3CN:soluzione acquosa al 2% di CH_3COOH (35+65 v/v),

agitando in bagno ad ultrasuoni e su vortex; infine, il campione è stato filtrato (0,45 μm). L'OTA è stata quindi determinata mediante analisi HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*); la separazione è stata effettuata con colonna Luna Phenyl-Hexyl (Phenomenex), utilizzando come fase mobile un gradiente CH_3CN:soluzione acquosa al 2% di CH_3COOH (da 35 a 67% di CH_3CN in 9 minuti) a flusso di 1,0 mL/min. La rivelazione è stata effettuata mediante fluorimetro impostato a $\lambda_{eccitazione}$=333 nm e $\lambda_{emissione}$=470 nm.

Analisi dei TCT

Dopo aver pesato 25 g di campione macinato, i TCT sono stati estratti con 100 mL di miscela CH_3CN:H_2O (84+16 v/v), agitando per 90 minuti. Dopo filtrazione su filtro a pieghe l'estratto è stato purificato mediante colonna Mycosep 227 (2), quindi un'aliquota di 2 mL dell'estratto purificato è stata sottoposta a derivatizzazione (formazione dei trimetilsilileteri) con trimetilsililimidazolo (TMSIM) nel seguente modo: dopo aggiunta di 100 μL di standard interno (diacetossiscirpenolo, DAS, a concentrazione di 10 mg/kg) ed evaporazione completa sotto flusso di N_2, sono stati aggiunti 200 μL di derivatizzante (TMSIM+trimetilclorosilano=1:0,2 v/v) lasciando reagire al buio per 15 minuti. Successivamente sono stati aggiunti 800 μL di esano e 1 mL di H_2O; dopo centrifugazione, la fase superiore in esano è stata trasferita in un vial da 2 mL. La separazione dei TCT è stata effettuata mediante GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*), con colonna capillare Zebron-5MS1 (30 m x 0,25 mm i.d) e gas di trasporto He con pressione di 55 Kpa, impostando il seguente programma di temperatura: 125°C per 1 min, 125-240°C a 10°C/min, isoterma per 6 min, 240-285°C a 10°C/min, isoterma per 1 minuto, 285-300°C a 30°C/min, isoterma per 1 minuto. Sono stati iniettati 2 μL con rapporto di partizione (split) 1:30 e tecnica PTV (*Programmed-Temperature Vaporizer*) *solvent split*. La rivelazione dei TCT è stata effettuata mediante spettrometro di massa a trappola ionica con un'energia di ionizzazione di 70 eV e con tecnica SIM (*Selected Ion Monitoring*) (3).

I frammenti usati per la quantificazione sono stati: 393, 407 per il DON, 377, 392 per il 3-Ac-DON, 290, 378 per il DAS, 392, 407 per il 15-Ac-DON, 377, 392 per il NIV, 287, 466 per la HT-2, 290, 436 per la T-2.

Risultati e discussione

Percentuali di recupero e limiti di rivelazione

Sono state valutate le percentuali di recupero dei metodi utilizzati, aggiungendo ad aliquote di un campione risultato esente da contaminazione da micotossine, un volume misurato di standard delle micotossine considerate, in modo da avere una contaminazione da OTA pari a 1 μg/kg e da TCT pari a 1000 μg/kg. I metodi hanno dato percentuali di recupero tra il 90 e il 95% con una buona ripetibilità indicata da una deviazione standard inferiore al 6,3%. I limiti di rivelazione (*Limit of Detection*, LOD, rapporto segnale/rumore 3:1) e di quantificazione (*Limit of Quantification,* LOQ, rapporto segnale/rumore 10:1) sono risultati rispettivamente di 0,02 e 0,05 μg/kg per l'OTA, 2 e 5 μg/kg per i TCT di tipo B e di 10 e 20 μg/kg per quelli di tipo A.

Contaminazione da OTA dei biscotti

La contaminazione da OTA nei biscotti è risultata bassa (Tabella 1), sempre molto inferiore ai limiti di legge. La percentuale di campioni positivi è stata del 53,3% e il valore più elevato è

risultato pari a 0,74 µg/kg. Solo in 3 campioni (5,0%), è stata riscontrata una contaminazione da OTA superiore a 0,50 µg/kg (limite per il *baby food*); il valore medio globale è stato pari a 0,15±0,18 µg/kg. Non è stata rivelata nessuna differenza statisticamente significativa tra le marche considerate. È stata invece osservata una maggiore, anche se limitata, contaminazione per i campioni di ogni marca relativi al quinto e sesto prelievo (agosto-settembre 2008).

Tabella 1. Contaminazione da OTA (µg/kg) dei biscotti prelevati a cadenza mensile

Data	Marca biscotti				
	A	B	C	D	E (*hard discount*)
1 aprile 2007	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
2 maggio 2007	0,08	<0,02	0,08	<0,02	<0,02
3 giugno 2007	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
4 luglio 2007	<0,02	0,08	0,13	0,13	0,24
5 agosto 2007	0,37	0,35	0,51	0,12	0,18
6 settembre2007	0,48	0,34	0,68	0,30	0,74
7 ottobre 2007	0,27	<0,02	0,47	0,42	0,23
8 novembre 2007	0,05	<0,02	<0,02	<0,02	0,17
9 dicembre 2007	<0,02	<0,02	<0,02	0,16	0,38
10 gennaio 2008	<0,02	<0,02	0,35	<0,02	0,26
11 febbraio 2008	0,22	<0,02	0,11	0,34	<0,02
12 marzo 2008	0,16	<0,02	0,26	0,35	<0,02
media	0,14±0,16	0,07±0,13	0,22±0,23	0,16±0,16	0,19±0,22

Contaminazione da DON dei biscotti

Tra i TCT, il DON è risultato presente nel 93,3% dei campioni, mentre gli altri TCT non sono mai stati rilevati (Tabella 2). Nessun campione è risultato avere una concentrazione di DON superiore al limite di legge di 500 µg/kg per i prodotti da forno. Il valore più elevato è stato pari a 278 µg/kg mentre livelli di DON superiori a 200 µg/kg (limite per il *baby food*) sono stati riscontrati solo in 2 campioni (3,3%). Il valore medio globale è stato pari a 39±49 µg/kg. Come per l'OTA, non sono state osservate differenze statisticamente significative tra le diverse marche considerate, anche se i tre valori più alti sono relativi alla stessa marca (C, periodo dicembre 2007 – febbraio 2008).

Tabella 2. Contaminazione da DON (µg/kg) dei biscotti prelevati a cadenza mensile

Data	Marca biscotti				
	A	B	C	D	E (*hard discount*)
1 aprile 2007	9	46	21	6	13
2 maggio 2007	38	66	38	10	12
3 giugno 2007	10	49	23	8	8
4 luglio 2007	48	<2	37	10	8
5 agosto 2007	9	<2	26	50	19
6 settembre 2007	20	47	15	39	2
7 ottobre 2007	25	80	<2	47	7
8 novembre 2007	11	36	<2	32	30
9 dicembre 2007	23	28	125	37	69
10 gennaio 2008	38	41	278	27	76
11 febbraio 2008	52	20	254	65	43
12 marzo 2008	19	17	36	28	105
media	25±15	36±24	71±96	30±19	33±33

Conclusioni

Questa indagine ha rilevato che le contaminazioni da OTA e TCT di biscotti tipo frollini, provenienti da cinque diverse marche italiane, sono basse e quasi trascurabili; nessun campione è risultato avere un livello di contaminazione superiore a quello di legge per i prodotti da forno. Inoltre, quasi tutti i campioni hanno rispettato anche il limite per il *baby food*, indicando che possono essere consumati anche da bambini nei primi anni di vita. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative fra le marche leader del mercato e quella presente solo nei punti vendita Hard Discount.

Bibliografia

1. Scudamore KA, Mac Donald SJ. A collaborative studiy of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up. *Food Additives and Contaminants* 1998;15:401-10.
2. Radova Z, Holadova K, Hajslova J. Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. *The Journal of Chromatography A* 1998;829:259-67.
3. Eskola M, Rizzo A. Sources of variation in tha analysis of trichothecenes in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. *Mycotoxin Research*, 2001;17:68-87.

CONTAMINAZIONE INDIRETTA E DIRETTA DA OCRATOSSINA A DI CARNI E SALUMI TIPICI

Amedeo Pietri, Terenzio Bertuzzi, Alessia Gualla, Mauro Morlacchini, Gianfranco Piva
Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

Introduzione

L'Ocratossina A (OTA) è una micotossina prodotta principalmente da *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* e *P. nordicum*; è cancerogena, teratogena e immunodepressiva, può provocare nefriti ed epatiti, ed è classificata dallo IARC (*International Agency for Research on Cancer*) nel gruppo 2B (possibile sostanza ad azione cancerogena nei confronti dell'uomo). Possono essere contaminati sia alimenti di origine vegetale, specialmente cereali, vino e spezie, sia di origine animale, in particolare carni suine e salumi. La presenza di OTA nei prodotti carnei può essere conseguenza o di una contaminazione indiretta, dovuta ad una dieta contaminata somministrata agli animali, o, nel caso di prodotti stagionati, di una contaminazione diretta, causata principalmente da alcuni ceppi di *Aspergilli* e *Penicillia*, presenti negli impianti di stagionatura (1,2). In Italia, è in vigore un limite massimo di contaminazione da OTA nei prodotti carnei pari a 1 μg/kg (Circolare del Ministero della Sanità n. 10 del 09/06/1999); la necessità di fissare un limite è stata espressa anche dalla Comunità Europea, che ha incluso questi prodotti tra quelli da regolamentare (Reg. UE 1881/2006). Alcune indagini, effettuate su prodotti a base di carne suina acquistati al dettaglio, hanno mostrato un'incidenza di OTA non trascurabile (3,4).

Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'entità delle due differenti modalità di contaminazione. Inizialmente è stata determinata, dopo la macellazione, la concentrazione di OTA nel tessuto muscolare e adiposo di suini pesanti alimentati con mangimi naturalmente contaminati a diversi livelli; successivamente, l'OTA è stata ricercata in alcuni prodotti, preparati dai medesimi tessuti, stagionati in impianti industriali (salame, pancetta, coppa e prosciutto crudo).

Materiali e metodi

Prova su animali, carni fresche e stagionate

La prova è stata condotta utilizzando 24 suini adulti *Large White*, suddivisi in 4 gruppi di 6 soggetti ciascuno (3 femmine e 3 castrati). All'inizio della prova l'età era di circa 200 giorni e il peso vivo di circa 140-150 kg. Dopo un periodo di adattamento, è seguito un periodo sperimentale della durata di 14 giorni, durante il quale ogni gruppo è stato alimentato in modo differente. Al gruppo T0 è stato somministrato un mangime non contaminato da OTA, agli altri gruppi uno naturalmente contaminato a diversi livelli: 42 mg/kg per il gruppo T1, 83 mg/kg per il T2 e 171 mg/kg per il T3. La quantità di mangime somministrato (circa 3,6 kg al giorno) è stata calcolata in base al peso corporeo di ogni animale. Al termine del periodo sperimentale, gli animali sono stati macellati e di ciascuno le porzioni muscolari e adipose sono state lavorate per

la preparazione di alcuni prodotti tipici, quali salame, pancetta, coppa e prosciutto crudo. Le spezie usate per la preparazione dei prodotti stagionati sono risultate non contaminate da OTA. I prodotti sono stati successivamente stagionati in tre impianti industriali per tempi diversi: 50 giorni per i salami, 4, 6 e 14 mesi rispettivamente per le pancette, le coppe e i prosciutti. Dai tessuti muscolari, adiposi e dai prodotti stagionati sono stati prelevati campioni di 200 g per la determinazione dell'OTA; per i prosciutti l'analisi è stata condotta sia su un campione relativo alla parte interna, sia su uno prelevato in vari punti 1 cm sotto la superficie. I campioni sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'analisi.

Analisi dell'OTA

L'estrazione di OTA nei campioni è stata effettuata mediante digestione enzimatica del campione con pancreatina (5). Per avere un campione il più possibile omogeneo, ai campioni esterni di prosciutto crudo, prima dell'estrazione, è stato aggiunto lentamente un volume noto di H_2O distillata sotto continua agitazione, fino ad ottenere una pasta omogenea (*slurry*). Ad un'aliquota di 5 g di campione (o di una quantità di *slurry* equivalente a 5 g di campione iniziale), pesati in un provettone da centrifuga da 250 mL, sono stati aggiunti 100 mL di soluzione di pancreatina all'1% in tampone fosfato 0,2 M a pH 7,5 (160 mL di $NaH_2PO_4*H_2O$ 0,2 M + 840 mL di Na_2HPO_4 0,2 M); il campione è stato quindi posto in stufa termostato a 37°C per 3 ore sotto continua agitazione. Al termine della digestione, dopo centrifugazione a 8000 g a 4°C per 15 minuti, un'aliquota di 5 mL di surnatante, diluita con 5 mL di PBS (*Phosphate Buffered Saline*), è stata purificata mediante colonna ad immunoaffinità (Ochratest, Vicam). Dopo lavaggio della colonna con 2,5 mL di PBS, l'OTA è stata eluita in provetta graduata con 3 mL di CH_3CN. L'estratto è stato concentrato sotto flusso di N_2, quindi riportato ad 1 mL con la miscela CH_3CN:H_2O (35+65 v/v), agitando in bagno ad ultrasuoni e su vortex; infine, il campione è stato filtrato (0,45 μm). L'OTA è stata quindi determinata mediante analisi HPLC; la separazione è stata effettuata con colonna Luna Phenyl-Hexyl (Phenomenex) e, come fase mobile, con un gradiente CH_3CN:soluzione acquosa al 2% di CH_3COOH a flusso di 1,0 mL/min (da 35 a 67% di CH_3CN in 9 minuti). La rivelazione è stata effettuata mediante fluorimetro impostato a $\lambda_{eccitazione}$=333 nm e $\lambda_{emissione}$=470 nm.

Risultati e discussione

Percentuali di recupero, limiti di rivelazione e quantificazione dell'OTA

Le percentuali di recupero sono state calcolate aggiungendo a campioni non contaminati di tessuto muscolare, adiposo e di prosciutto crudo, volumi noti di una soluzione standard di OTA in modo da avere un livello di contaminazione pari a 1,0 e 2,0 mg/kg. I valori ottenuti sono risultati compresi tra 83,2 e 92,0%. I limiti di rivelazione (*Limit of Detection,* LOD) e di quantificazione (*Limit of Quantification,* LOQ) sono stati rispettivamente di 0,03 e 0,08 mg/kg.

OTA in tessuto muscolare e adiposo

Dai valori di OTA relativi al tessuto muscolare e adiposo (Tabella 1), si può osservare per i gruppi T2 e T3 una contaminazione media di poco superiore a 1,00 μg/kg (limite massimo per le carni fissato dalla legislazione italiana). Come riportato in precedenti lavori, il tessuto muscolare è risultato più contaminato di quello adiposo. Il rapporto percentuale tra la

concentrazione nel tessuto e quella nel mangime diminuisce dal gruppo T1 al T3: da 1,76 a 1,30 per il tessuto muscolare, da 1,62 a 1,00 per quello adiposo. Questi risultati indicano che, nel caso di una somministrazione non molto prolungata nel tempo, il passaggio di OTA dalla dieta ai tessuti è basso e diventa non trascurabile solo ad alte concentrazioni nel mangime. Con una contaminazione di 50 µg/kg, valore di riferimento per i mangimi per suini proposto dalla Commissione Europea nella Raccomandazione 2006/576, si possono avere concentrazioni di OTA nelle carni ad un livello vicino ad 1 µg/kg.

Tabella1. Media dei livelli di OTA nei campioni di tessuto muscolare e adiposo

Gruppo	Tessuto muscolare (µg/kg)		Tessuto adiposo (µg/kg)	
	media	min-max	media	min-max
T0	< LOD	/	< LOD	/
T1	0,74	0,60-0,89	0,68	0,57-0,79
T2	1,27	1,08-1,45	1,04	0,86-1,26
T3	2,23	1,67-3,40	1,71	1,33-2,58

OTA in pancetta, salame, coppa e prosciutto crudo

I risultati (Tabelle 2 e 3) relativi ai diversi prodotti stagionati permettono diverse considerazioni. Per i gruppi T1, T2 e T3, i campioni di salame, di coppa e di pancetta, mostrano un aumento di concentrazione di OTA rispetto ai valori del tessuto muscolare e del tessuto adiposo con i quali sono stati preparati, mentre per i campioni interni di prosciutto i valori sono rimasti simili.

Tabella 2. Valori medi di OTA (µg/kg) nei campioni di pancetta, salame e coppa.

Gruppo	Pancetta		Salame		Coppa	
	media	min-max	media	min-max	media	min-max
T0	< LOD	-	0,54	0,41-0,76	0,18	<0,03-0,72
T1	0,65	0,56-0,85	1,62	0,87-2,88	1,53	0,66-3,20
T2	1,33	0,99-1,69	2,41	1,65-3,67	2,93	2,38-4,48
T3	2,30	1,95-2,59	3,60	2,76-5,62	3,72	2,74-5,38

Tabella 3. Valori medi di OTA (µg/kg) nei campioni di prosciutto crudo.

Gruppo	Prosciutto interno		Prosciutto esterno	
	media	min-max	media	min-max
T0	<0,03	/	21,44	<0,03-104,68
T1	1,04	0,58-1,59	69,39	1,25-314,09
T2	1,21	1,10-1,35	1,85	1,22-2,36
T3	2,46	2,13-2,91	73,12	3,27-258,77

L'aumento di concentrazione rivelato nei campioni di coppa, salame e pancetta è in parte dovuto alla perdita di acqua dei prodotti stagionati con conseguente concentrazione dell'OTA, ma anche ad una possibile contaminazione diretta, dovuta alla presenza di muffe ocratossigene negli stabilimenti di stagionatura. Invece, il non riscontrato aumento per i campioni interni di prosciutto potrebbe essere dovuto ad una possibile idrolisi del legame peptidico dell'OTA ad

opera di enzimi proteolitici, avvenuta durante il lungo tempo di stagionatura (14 mesi). Come conseguenza di questi fattori, si può osservare che all'interno di ogni gruppo, i prodotti contenenti concentrazioni più elevate di OTA sono la coppa e il salame. La distribuzione della tossina nei diversi prodotti non è quindi in accordo con il fatto che l'OTA, molecola abbastanza polare, si accumula maggiormente nel tessuto muscolare rispetto a quello adiposo, poiché il prosciutto crudo, che ha un tenore lipidico normalmente inferiore al salame e alla coppa, mostra livelli di contaminazione inferiori. Oltre all'attesa contaminazione indiretta, si può osservare, dalla presenza di OTA in alcuni prodotti del gruppo T0 (tutti i campioni di salame, due di coppa e 5 esterni di prosciutto crudo) e soprattutto dai valori molto alti riscontrati nei campioni esterni di prosciutto (10 campioni con una contaminazione superiore a 10 µg/kg, massimo 314,1 µg/kg), che si è verificata una elevata contaminazione diretta in due dei tre impianti di stagionatura, confermando i risultati di alcuni precedenti lavori (1, 5).

Conclusioni

Da questo studio si può osservare come la somministrazione ai suini di una dieta contaminata da OTA, determina preoccupanti concentrazioni della tossina nei tessuti e nei prodotti carnei stagionati solo a concentrazioni nei mangimi molto elevate, superiori a 50 µg/kg, limite massimo proposto dalla CE. Una presenza di muffe ocratossigene negli impianti di stagionatura può invece aumentare sensibilmente la concentrazione di OTA nei prodotti stagionati, in modo molto più rilevante rispetto alla contaminazione indiretta. Particolarmente a rischio possono essere i prosciutti crudi, che subiscono una stagionatura molto lunga. Oltre ad effettuare un costante monitoraggio della contaminazione da OTA nei mangimi per suini, è quindi importante prevenire la proliferazione di muffe ocratossigene negli impianti di stagionatura.

Bibliografia

1. Battilani P, Pietri A, Giorni P, Formenti S, Bertuzzi T, Toscani T, Virgili R, Kozakiewicz Z. Penicillium populations in dry-cured ham manufacturing plants. *Journal of Food Protection* 2007;70, 4, 975-80.
2. Spotti E, Chiavaro E, Lepiani A, Colla F. Mould and ochratoxin A contamination of pre-ripened anf fully ripened hams. *Industria Conserve* 2001;76:341.
3. Pietri A, Bertuzzi T, Gualla A, Piva G. Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle and pork products from Northern Italy. *Italian Journal of Food Science*, 2006;1(18):1-8.
4. Zannotti M, Malagutti L, Sciaraffa F, Corti M. Indagine preliminare sul contenuto di Ocratossina in salumi provenienti dalla grande distribuzione. In: Greppi GF, Enne G (Ed.). *Atti 36° Simposio Internazionale di Zootecnia*, Ancona, 27 aprile 2001. p. 78-84.
5. Pietri A, Bertuzzi T, Gualla A, Piva G. Determinazione dell'Ocratossina in prodotti carnei: nuovo metodo enzimatico di estrazione. In: Miraglia M, Brera C (Ed.). *1° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 novembre 2004. Atti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporti ISTISAN 05/42). p. 322-5.

AFLATOSSINA M_1 NEL LATTE: DISTRIBUZIONE TRA I PRODOTTI DELLA TRASFORMAZIONE CASEARIA TIPO GRANA

Amedeo Pietri (a), Terenzio Bertuzzi (b), Annalisa Mulazzi (a), Gianfranco Piva (a), Alberto Pecorari (b), Gianluca Gambini (b), Marco Nocetti (b)
(a) Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza
(b) Consorzio del Formaggio Parmigiano-Reggiano, Reggio Emilia

Introduzione

L'Aflatossina M_1 (AFM_1) è il 4-idrossi-derivato dell'Aflatossina B_1 (AFB_1) e può essere presente nel latte di animali in lattazione che hanno consumato mangimi contaminati da AFB_1. Se il latte contaminato viene usato nella produzione di formaggi, questi presentano una concentrazione di AFM_1 maggiore di quella del latte di partenza; questo fattore di arricchimento è dovuto ad un'interazione idrofobica che si viene a formare tra l'AFM_1 e la caseina nel corso della caseificazione. Il Reg. CE 1881/2006, che stabilisce i livelli massimi di alcuni contaminanti negli alimenti, fissa un limite massimo per l'AFM_1 di 0,050 µg/kg per il latte e di 0,025 µg/kg per il latte destinato ai lattanti, mentre per i prodotti lattiero-caseari i valori massimi ammissibili vanno calcolati tenendo conto della concentrazione provocata dall'essiccazione o dalla trasformazione.

In questo studio, sono state condotte alcune mini-caseificazioni per la produzione di formaggio tipo grana, con l'obiettivo di valutare il fattore di arricchimento nella cagliata e la distribuzione dell'AFM_1 nei prodotti derivanti dal processo di caseificazione.

Materiali e metodi

Caseificazioni

Lo studio ha previsto, per 5 giorni non consecutivi, la raccolta di latte ottenuto da alcune vacche alimentate il giorno precedente con mais naturalmente contaminato da AFB_1.

Il latte di ogni mungitura è stato quindi utilizzato per due differenti processi di trasformazione casearia tipo grana, per un totale di 10 caseificazioni; queste sono state eseguite su scala ridotta, utilizzando 20-25 L di latte. L'analisi per la determinazione di AFM_1 è stata eseguita nel latte intero, nella crema di affioramento (panna), nel latte di caldaia, nel siero innesto, nella cagliata, nel siero cotto, nella ricotta, nella scotta (siero residuo della produzione della ricotta), nel burro e nel latticello (Figura 1).

Un'aliquota di 200 mL per i campioni liquidi e di 50-200 g per quelli solidi è stata conservata a -20°C fino al momento dell'analisi.
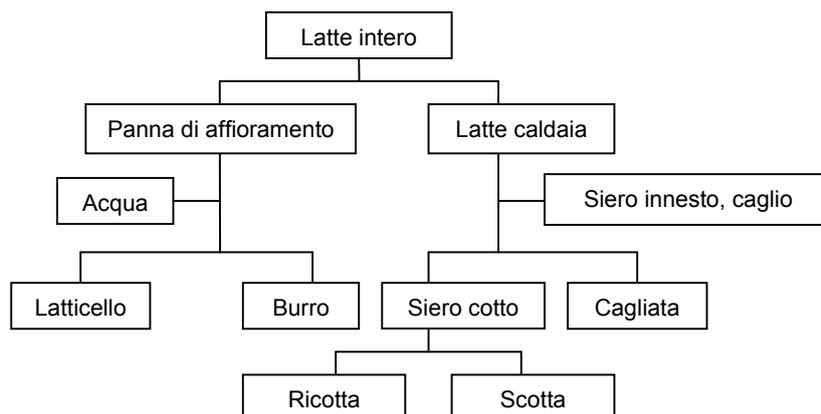
Figura 1. Schema generale delle mini-caseificazioni

Analisi di AFM_1 nel latte, siero cotto, scotta, latticello

Un'aliquota di 40 mL di campione è stata centrifugata per 10 min. a 7000 g e a 4°C e successivamente filtrata su filtro di carta; 20 mL del filtrato sono stati quindi purificati mediante colonna ad immunoaffinità (R-Biopharm) (1). Dopo lavaggio della colonna con 5 mL di acqua distillata, l'AFM_1 è stata eluita in provetta graduata con 2,5 mL di CH_3OH. L'estratto purificato è stato concentrato sotto flusso di N_2, quindi portato a 2 mL con la miscela CH_3CN:H_2O=25:75, agitando in bagno ad ultrasuoni e su vortex. L'estratto è stato infine filtrato (0,45 µm) prima dell'analisi HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

Analisi di AFM_1 in formaggi, panna, burro e ricotta

Ad un'aliquota di 5 g di campione, pesati in un provettone da centrifuga, sono stati aggiunti 50 mL di una soluzione di pepsina allo 0,2% in HCl 0,075 N (2). Il campione, dopo aver controllato che il pH della soluzione fosse compreso tra 2,4 e 3,0 (eventualmente corretto con NaOH 0,1 N), è stato posto in stufa termostato a 42°C per 16 ore sotto continua agitazione. Al termine della digestione enzimatica, la soluzione è stata neutralizzata a pH 7-7,5 con NaOH 1N (3-5 mL), centrifugata a 11700 g a 4°C per 10 min., infine filtrata su filtro di carta. Un'aliquota di 30 mL del filtrato è stata purificata mediante colonna di immunoaffinità (R-Biopharm); dopo lavaggio della colonna con 5 mL di acqua distillata, l'AFM_1 è stata eluita in provetta graduata con 2,5 mL di CH_3OH. L'estratto è stato quindi evaporato sotto flusso di N_2 e ripreso con 1 mL di miscela CH_3CN:H_2O=25:75, agitando in bagno ad ultrasuoni e su vortex; infine, è stato filtrato (0,45 µm) prima dell'analisi HPLC.

Analisi HPLC

La separazione cromatografica è stata effettuata mediante colonna RP-18 (125x4,0 mm, Merck), e fase mobile CH_3CN:H_2O=25:75 a flusso 1 mL/min.; l'AFM_1 è stata determinata con rivelazione fluorimetrica ($\lambda_{eccitazione}$=365 e $\lambda_{emissione}$=440 nm).

Risultati e discussione

Percentuale di recupero e limiti di rivelazione

Nel caso dei campioni di latte, siero cotto, scotta e latticello, il limite di rivelazione e di quantificazione sono stati rispettivamente di 0,001 e 0,003 µg/kg. Per verificare l'accuratezza del metodo di analisi, l'AFM_1 è stata estratta da un campione di latte in polvere certificato con un valore di AFM_1 pari a 0,260 µg/kg (FAPAS); l'analisi, effettuata in triplo, ha dato un valore medio di 0,254±0,005 µg/kg. Nel caso di campioni di formaggio, panna, burro e ricotta il limite di rivelazione e di quantificazione sono stati di 0,010 e 0,030 µg/kg. Per il formaggio tipo grana, sono state effettuate prove di recupero a due livelli (0,250 e 0,500 µg/kg, in triplo), aggiungendo ad un campione non contaminato (maturazione 3 mesi) un volume noto di una soluzione standard di AFM_1; i valori ottenuti sono risultati compresi tra 94,8% e il 98,2%. La deviazione standard è risultata sempre inferiore al 2,5%.

Caseificazioni

Le concentrazioni di AFM_1 nei campioni di latte intero utilizzati per le caseificazioni erano comprese tra 0,027 e 0,460 µg/kg. Nella Tabella 1 sono riportate le concentrazioni di AFM_1 nei vari prodotti.

Tabella 1. Valori di AFM_1 (µg/kg) nel latte intero e nei prodotti della caseificazione

Caseificaz.	Latte intero	Panna	Latte caldaia	Cagliata	Siero cotto	Scotta	Ricotta	Burro	Latticello
1	0,040	< 0,010	0,039	0,122	0,022	0,019	0,040	< 0,010	0,008
2	0,027	0,019	0,021	0,082	0,013	0,012	0,046	< 0,010	0,013
3	0,081	0,044	0,083	0,343	0,056	0,049	0,115	< 0,010	0,026
4	0,063	0,040	0,062	0,178	0,040	0,029	0,180	< 0,010	0,019
5	0,043	0,017	0,035	0,154	0,021	0,016	0,046	< 0,010	0,009
6	0,038	0,020	0,038	0,136	0,025	0,017	0,043	< 0,010	0,009
7	0,270	0,113	0,273	0,966	0,168	0,128	0,280	0,017	0,047
8	0,335	0,154	0,333	1,202	0,217	0,184	0,374	0,107	0,094
9	0,386	0,171	0,365	1,234	0,213	0,128	0,280	0,050	0,062
10	0,460	0,223	0,480	1,699	0,298	0,184	0,374	0,110	0,091

Considerando separatamente i diversi passaggi delle caseificazioni, si può osservare che, dopo il processo di scrematura, le concentrazioni di AFM_1 del latte di caldaia sono risultate molto simili a quelle del latte intero; la distribuzione media percentuale, calcolata come rapporto fra le quantità di AFM_1, è stata del 90±9% nel latte scremato e solo dell'1,6±0,6% nella panna (con un bilancio di massa pari a 92±9%). Nel processo di caseificazione, la resa media è stata pari al 7,5% (20 kg di latte → 1,5 kg di cagliata); le cagliate hanno evidenziato concentrazioni di AFM_1 tra 0,082 e 1,699 µg/kg, con un fattore di arricchimento medio pari a 3,6±0,5. Con un bilancio di massa medio vicino al 90%, la distribuzione percentuale media di AFM_1 è stata pari al 27±3% nella cagliata e al 60±4% nel siero cotto. Nei campioni di siero innesto non è stata rilevata AFM_1. Il siero cotto è stato quindi utilizzato per la produzione della ricotta; il fattore di arricchimento medio in questa trasformazione è risultato pari a 2,1±0,9. La distribuzione

percentuale nella ricotta, pari a 5±3% è risultata piuttosto bassa, evidenziando come la tossina presente nel siero rimanga prevalentemente nella scotta.

Infine, l'ultima parte del processo ha previsto l'impiego della panna per la preparazione del burro. Le concentrazioni di AFM_1 nel burro sono state superiori al limite di rivelazione solo nelle ultime 4 caseificazioni (con le concentrazioni nel latte di partenza più elevate); sia il fattore di arricchimento che la distribuzione percentuale sono risultati molto bassi e variabili (per le basse concentrazioni e le difficoltà nel recupero quantitativo del burro), pari rispettivamente a 0,2±0,3 e a 9±14%.

Conclusioni

In conclusione, ipotizzando per il latte intero una concentrazione di 0,100 µg/kg, le concentrazioni medie di cagliata, siero cotto, ricotta e burro risulterebbero rispettivamente di 0,348, 0,060, 0,123 e 0,021 µg/kg (Figura 2).
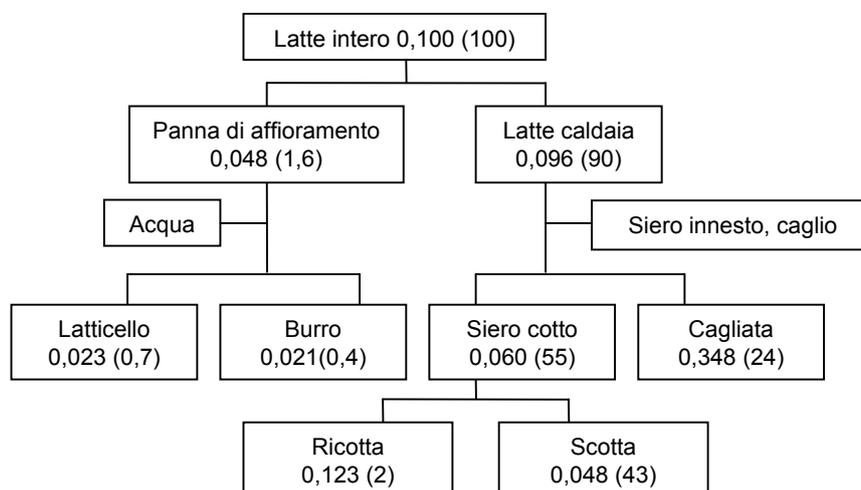
Figura 2. Concentrazioni (µg/kg) e percentuali di distribuzione (tra parentesi) di AFM_1 nei prodotti della caseificazione, partendo da un latte contaminato a livello di 0,100 µg/kg

Bibliografia

1. Mortimer DN, Gilbert J, Shepher MJ. Rapid and highly sensitive analysis of AFM1 in liquid and powdered milk using an affinity column cleanup. *Journal of Chromatography* 1987;407:393-8.
2. Pietri A, Bertuzzi T, Fortunati P, Piva G. Determinazione dell'Aflatossina M1 nei formaggi: nuovo metodo enzimatico di estrazione. In: Miraglia M, Brera C (Ed.). *1° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 novembre 2004. Atti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporti ISTISAN 05/42). p. 318-21.

SECONDA SESSIONE
Gestione del rischio da micotossine

CONTROLLO UFFICIALE DELLE MICOTOSSINE IN ITALIA

Silvio Borrello
Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e Sicurezza degli Alimenti,
Direzione Generale della della Sicurezza degli alimenti e della Nutrizione, Ministero della Salute, Roma

Introduzione

Il 1° gennaio 2006 segna l'entrata in vigore di una serie di norme comunitarie (Regolamenti CE 852/2004, 853/2004, 854/2004, 882/2004 e Direttiva 2004/41/CE), conosciute come "Pacchetto Igiene", che rappresentano la normativa di riferimento riguardo l'igiene della produzione degli alimenti e dei controlli a cui essi devono essere sottoposti. Lo scopo è garantire un livello elevato di tutela della salute umana assicurando l'immissione sul mercato europeo di alimenti sicuri e sani.

Ai fini dell'attuazione concreta del cosiddetto "pacchetto igiene", ogni Stato individua le autorità competenti sanitarie per l'attività di controllo ufficiale. Il controllo ufficiale si effettua in modo regolare e/o nei casi in cui si sospetti la non conformità dei prodotti.

Le competenti Autorità degli Stati Membri devono elaborare programmi che definiscono la natura e la frequenza dei controlli che devono essere effettuati regolarmente durante un determinato periodo.

L'art. 2 del Reg. CE 882/2004 fornisce le seguenti definizioni:

> "Controllo ufficiale: qualsiasi forma di controllo eseguita dall'autorità competente o dalla Comunità per la verifica della conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali."
> "Autorità competente: l'autorità centrale di uno Stato Membro competente per l'organizzazione di controlli ufficiali o qualsiasi altra autorità cui è conferita tale competenza."

In relazione all'autorità competente, l'art. 4 del Reg. CE 882/2004 afferma che gli Stati membri designano le autorità competenti responsabili dei controlli ufficiali e per far sì che i controlli possano essere espletati in modo efficace ed efficiente, le autorità competenti, dispongono di un'adeguata capacità di laboratorio, di un numero sufficiente di personale adeguatamente qualificato e di strutture e attrezzature appropriate.

Pertanto, sono legittimati ad effettuare i controlli gli Enti che dispongono di un apparato non comune in termini di adeguata competenza tecnica, professionalità specifica e complesso di attrezzature e strumenti.

L'art. 2 del DL.vo n. 193/2007 (attuazione della Direttiva 2004/41/CE relativa ai controlli in materia di sicurezza alimentare e applicazione dei regolamenti comunitari nel medesimo settore) chiarisce quanto segue:

> "Ai fini dell'applicazione dei regolamenti (CE) 852/2004, 853/2004, 854/2004 e 882/2004, e successive modificazioni, per le materie riguardanti la sicurezza alimentare, le Autorità competenti sono il Ministero della Salute, le Regioni e le Province autonome di Trento e di Bolzano e le Aziende Unità Sanitarie Locali, nell'ambito delle rispettive competenze".

Il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, di seguito indicato come Ministero della Salute, è l'autorità centrale delle Stato.

Avvalendosi del supporto tecnico scientifico dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e in stretta collaborazione con il Comando Carabinieri per la Tutela della Salute, che opera attraverso i Nuclei Antisofisticazione e Sanità (NAS) sul tutto territorio nazionale, soprattutto nell'ambito della repressione e della prevenzione, il Ministero della Salute svolge compiti di indirizzo e di coordinamento generale in materia di sicurezza alimentare.

Il Ministero della Salute opera, a livello centrale, attraverso il Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti (DSPVNSA). A livello territoriale, per il controllo alle frontiere, si avvale dei propri Uffici periferici, ovvero gli Uffici di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera (USMAF), degli Uffici Veterinari Periferici, che comprendono i Posti di Ispezione Frontaliera (PIF) e gli Uffici Veterinari per gli Adempimenti Comunitari (UVAC).

Al Ministero spettano, altresì, compiti di elaborazione e adozione dei piani pluriennali di controllo e di supervisione e controllo sulle attività delle Regioni/Province autonome e Aziende Sanitarie Locali (ASL).

A livello periferico, le Regioni/Province autonome indirizzano e coordinano le attività territoriali delle ASL, vigilano sull'attività di queste ultime ed elaborano e adottano i piani regionali di controllo.

A livello locale, i Dipartimenti di prevenzione delle ASL (Servizi Igiene degli Alimenti e Nutrizione, SIAN e Servizi Veterinari, SV) pianificano, programmano ed eseguono i controlli ufficiali sugli operatori del settore alimentare (OSA).

Controlli ufficiali sul territorio

Il controllo ufficiale delle micotossine rientra nell'ambito delle operazioni di vigilanza e di controllo degli alimenti e delle bevande in Italia, dirette e coordinate dal Ministero della Salute, Direzione Generale della Sicurezza degli Alimenti e della Nutrizione del DSPVNSA.

Ogni anno vengono raccolte le informazioni e i numeri delle operazioni che riguardano l'indagine più completa sul controllo della qualità dei prodotti alimentari lungo tutta la filiera produttiva.

Ne scaturisce alla fine una relazione annuale che contiene le notizie sulle attività di vigilanza e di controllo analitico sugli alimenti e le bevande svolte in Italia da tutte le Amministrazioni centrali e territoriali deputate a tale attività. Il rapporto viene annualmente pubblicato on line sul sito ufficiale del Ministero della Salute, quindi è a disposizione degli operatori e dei cittadini.

La vigilanza e il controllo ufficiale degli alimenti e delle bevande viene predisposto al fine di un costante monitoraggio, per la tutela della salute, dell'andamento delle frodi e delle sofisticazioni alimentari sul territorio nazionale, attuato a partire dal 1986 a seguito dell'uso fraudolento del vino al metanolo, il più grave scandalo di adulterazione alimentare in Italia con conseguenze drammatiche: nel 1986 delle partite di vino adulterato provocarono in Lombardia, Liguria e Piemonte la morte di 19 persone e arrecarono gravi lesioni ad atre 15.

Ai sensi dell'art. 6 della Legge n. 462/1986 – legge di conversione con modificazioni del DL n. 282/1986 recante misure urgenti in materia di prevenzione e repressione delle sofisticazioni alimentari – il Ministero della Salute definisce un programma sistematico di interventi mirati alla sicurezza alimentare, impartendo, nell'ambito delle proprie competenze, le direttive necessarie ai competenti servizi centrali e periferici di vigilanza e di repressione.

Ai sensi del comma 5 dell'art. 8, la relazione e i relativi dati vengono trasmessi annualmente al Parlamento.

Nei Paesi UE il controllo era armonizzato dalla Direttiva 89/397/CEE relativa al controllo ufficiale dei prodotti alimentari, recepita in Italia dal DL.vo n. 123/1993, poi abrogata dal regolamento (CE) n. 882/2004. Parimenti, il DL.vo n. 123/1993 è stato abrogato dal DL.vo n. 193/2007.

Le competenti Autorità degli Stati Membri devono elaborare programmi che definiscono la natura e la frequenza dei controlli che devono essere effettuati regolarmente durante un determinato periodo.

In Italia, il DPR 14 luglio 1995 è l'atto di indirizzo e coordinamento alle Regioni/Province sui criteri uniformi per l'elaborazione dei programmi di controllo ufficiale degli alimenti e bevande.

In base al suddetto Decreto, le Regioni/Province autonome predispongono appositi programmi per definire la natura e la frequenza dei controlli che debbono essere effettuati regolarmente nelle fasi di produzione, confezionamento, somministrazione e commercializzazione.

Il controllo sul territorio viene effettuato lungo tutta la filiera produttiva, dalla produzione primaria alla trasformazione, al magazzinaggio, al trasporto e al commercio, fino alla somministrazione e al consumo. Esso riguarda tutti i prodotti e gli additivi alimentari, nonché i materiali destinati a venirne a contatto, commercializzati nel territorio nazionale o destinati all'esportazione. L'indagine prevede accertamenti completi sul prodotto, attraverso ispezioni, campionamenti e analisi di laboratorio, sopralluoghi nell'ambito dell'ambiente di produzione e indagini sul personale addetto, nonché controlli sull'applicazione dei programmi di HACCP che le aziende predispongono per l'individuazione dei punti critici della catena produttiva.

Il controllo prevede attività ispettive, prelievo dei campioni e successiva analisi dei medesimi. Gli accertamenti analitici sono compiuti dai laboratori pubblici indicati dalle autorità competenti (gli Istituti Zooprofilattici sperimentali, IZS, le Agenzie regionali per la Protezione Ambientale, ARPA, ecc.).

Ogni anno, i Dipartimenti di prevenzione delle ASL e i laboratori pubblici trasmettono alla Regione/Provincia autonoma di appartenenza i risultati regionali relativi all'attività ispettiva e di campionamento, avvalendosi degli appositi modelli di rilevazione (Modelli A e Modelli B) riportati nell'Appendice 2 del DPR 14 luglio 1995, modificata dal DM 8 ottobre 1998 del Ministero della Sanità.

Il Ministero della Salute controlla i dati, li elabora a livello nazionale, li trasmette al Parlamento, quindi pubblica i risultati.

Micotossine: riferimenti normativi

Relativamente alle micotossine, il quadro normativo prevede riferimenti nazionali oltre che comunitari.

La Circolare del Ministero della Sanità n. 10 del 9 giugno 1999 (Direttive in materia di controllo ufficiale sui prodotti alimentari: valori massimi ammissibili di micotossine nelle derrate alimentari di origine nazionale, comunitaria e Paesi terzi), sebbene superata dall'attuale normativa comunitaria, resta in vigore per alcuni "valori guida" per quelle matrici o quelle micotossine non contemplate nel regolamento CE.

Così, ad esempio, nelle more dell'emanazione di una normativa comunitaria, restano in vigore i valori guida di Ocratossina A (OTA) per il caffè crudo, il cacao e i prodotti derivati, la birra, ecc. e delle Aflatossine totali per gli alimenti per l'infanzia e le piante infusionali o loro parti.

Sempre nelle more della emanazione di una normativa comunitaria, i tenori massimi ammissibili di OTA nel cacao indicati nella Circolare n. 10 sono stati successivamente sostituiti

dai tenori riportati nella Circolare del Ministero della Salute n. 6 del 28 novembre 2003 (Valori massimi ammissibili di OTA nel cacao). Nella circolare sono stati indicati i seguenti limiti massimi ammissibili di OTA nel cacao e prodotti a base di cacao:

- cacao (in polvere, magro, zuccherato) e cioccolato in polvere → 2 µg/kg
- cioccolato e cioccolatino (al latte, bianco, ripieno) → 0,5 µg/kg.

A livello comunitario è in vigore il Reg. CE 1881/2006 e s.m., che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari.

Nell'Allegato al Regolamento sono riportati i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Nel caso specifico, la Parte 2 dell'Allegato definisce i limiti delle micotossine per le diverse matrici alimentari.

Il campionamento e i metodi di analisi vengono fissati per le micotossine nel Reg. CE 401/2006 (Fissazione dei metodi di prelevamento e di analisi di campioni e dei metodi di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari).

L'Allegato I del Regolamento fissa i metodi di campionamento, ossia le disposizioni generali e i metodi di campionamento specifici per matrici alimentari (cereali e prodotti derivati, frutta secca, arachidi e frutta a guscio, spezie, latte e prodotti lattiero-caseari, alimenti e latte per lattanti e di proseguimento, caffè e prodotti a base di caffè).

L'allegato II stabilisce i criteri da applicare alla preparazione dei campioni e ai metodi di analisi.

Risultati del controllo ufficiale in Italia delle micotossine - anno 2008

Al fine di fornire un quadro d'insieme dei risultati conseguiti, si riporta un riepilogo nazionale delle attività analitiche svolte nell'ambito dei controlli ufficiali in Italia nel corso dell'anno 2008.

I campioni di prodotti alimentari analizzati, sia di origine animale che vegetale (Tabella 1), sono stati complessivamente 166.916, di cui 3.494 sono risultati non regolamentari, facendo registrare una percentuale di non conformità pari al 2,09%, inferiore di quella avutasi nel 2008 (2,7%).

Tabella 1. Attività analitica (ARPA e IZS) svolta nel corso dell'anno 2008, in riferimento ai campioni irregolari per micotossine

Classe alimenti	Campioni analizzati		Campioni irregolari per micotossine	
	totali	irregolari	n.	% sul totale
Prodotti lattiero-caseari	31251	949	8	0,02
Pesci, crostacei e molluschi	14105	392	7	0,05
Zuppe, brodi e salse	2322	45	1	0,04
Cereali e prodotti della panetteria	9607	333	10	0,1
Erbe, spezie, caffè e tè	1773	22	7	0,4
Cacao e preparazioni a base di cacao	392	8	2	0,5
Dolciumi	1378	37	4	0,3
Frutta secca a guscio rigido, spuntini	2080	159	145	7
Prodotti destinati ad una alimentazione particolare	1332	24	1	0,07
Totale	166916	3494	185	0,11

I campioni risultati irregolari per riscontro di micotossine sono, invece, 185, pari allo 0.11% sul totale dei campioni analizzati. La distribuzione per le diverse classi di prodotti alimentari è riportata in Tabella 1 e in Figura 1.
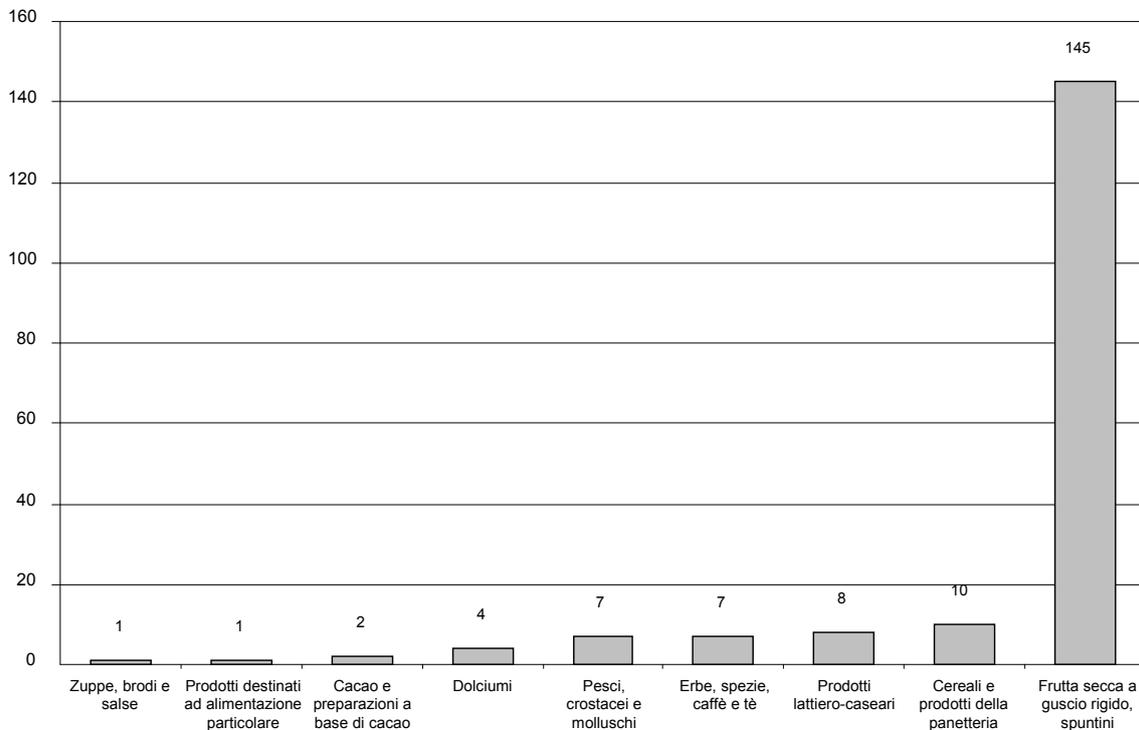
Figura 1. Irregolarità per classi di prodotti alimentari per riscontro di micotossine

Il maggior riscontro del contaminante si è avuto nella frutta secca a guscio rigido (145 irregolarità), seguita dai cereali e prodotti della panetteria e da pesci, crostacei e molluschi (riferiti a lesioni e neoplasie attribuibili a mangimi contaminati da micotossine), con 7 campioni irregolari.

Questi dati ricavati dai modelli B di rilevazione (riportati nell'Appendice 2 del DPR 14 luglio 1995, modificata dal DM 8 ottobre 1998), da una parte permettono di avere una conoscenza dell'incidenza percentuale sulle varie classi di alimenti ma, dall'altra, non permettono di ricavare informazioni più dettagliate sui diversi tipi di micotossine riscontrate nei singoli alimenti (Aflatossine B_1, G_1, B_2, G_2, M_1, Ocratossina, Zearalenone, Deossinivalenolo, Fumonisine, Patulina).

Si sono intraprese diverse iniziative per aggiornare i modelli di rilevazione, e favorire, di conseguenza, una maggiore categorizzazione dei rischi lungo la filiera alimentare. Si notano ancora numerose criticità, legate alla lentezza di recepimento di questa proposta di innovazione da parte di diversi Assessorati e Laboratori. Per far fronte alle nuove esigenze di programmazione regionale, senza tuttavia trascurare le richieste della Commissione europea, si renderà necessario apportare definitivamente delle modifiche ai modelli di rilevazione in uso, ottimizzando i flussi informativi relativi al controllo ufficiale dei prodotti alimentari.

Questa esigenza, già emersa nell'anno 2007, dovrà essere oggetto di incontri tecnici, prevedendo una revisione completa dei sistemi informativi.

Al contrario, attraverso il Sistema di Allerta Comunitario RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*), si è in grado di conoscere dettagliatamente le informazioni sui diversi tipi di micotossine riscontrate nei singoli alimenti. Questi dati, però, si riferiscono solo all'attivazione del sistema di allerta e non indicano, di conseguenza, quale è la percentuale di irregolarità su tutti i campioni sottoposti ad analisi e risultati conformi.

Nell'anno 2008 le notifiche RASFF che hanno riguardato le micotossine sono state 933 (Tabella 2), la maggior parte delle quali si riferiscono a respingimenti ai confini (85,9%). La maggior parte delle notifiche per micotossine, si riferiscono alle Aflatossine (AF) (902 notifiche), seguita dall'OTA (20 notifiche), Deossinivalenolo (DON) (4 notifiche), Patulina (PAT) (3 notifiche) e Fumonisine e Zearalenone (ZEA), con due segnalazioni ciascuno. In Tabella 3 sono riportati i dati riferiti al primo semestre dell'anno 2009, per un confronto.

Tabella 2. Notifiche di allerta attraverso il sistema RASFF per l'anno 2008 sui diversi tipi di micotossine riscontrate in alimenti e mangimi

Tipo di notifica di allerta	Notifiche RASFF	Campioni irregolari per micotossina					
	micotossine	AF	OTA	DON	Fumonisine	PAT	ZEA
Respingimenti ai confini	802	792	8	0	0	0	2
Allerta	52	40	5	4	1	2	0
Informazioni	79	70	7	0	1	1	0
Totale	933	902	20	4	2	3	2

Tabella 3. Numero di notifiche di allerta attraverso il RASFF per il primo semestre dell'anno 2009 sui diversi tipi di micotossine riscontrate in alimenti e mangimi

Tipo di notifica di allerta	NotificheRASFF	Campioni irregolari per micotossina		
	micotossine	AF	OTA	DON
Respingimenti ai confini	309	303	6	0
Allerta	32	29	1	2
Informationi	23	23	0	0
Totale	364	355	7	2

I respingimenti corrispondono ad una percentuale del 84,9% di tutte le notifiche per micotossine. Generalmente, i prodotti notificati per micotossine hanno origine extracominutaria come: Turchia, USA, Iran, Argentina, Cina, brasile, India, Egitto, ecc.

La maggior parte dei prodotti notificati per micotossine hanno origine extracomunitaria, in particolare provenienti da Turchia, USA, Iran, Argentina, Cina, India ed Egitto.

Le Aflatossine sono state riscontrate principalmente nella frutta secca, spezie e cereali.

L'Ocratossina A principalmente nel cacao e caffè. Per le altre micotossine, le notifiche si riferiscono allo Zearalenone e Fumonisine principalmente nel mais, Deossinivalenolo nel grano e Patulina (succhi di mele, e omogeneizzati).

Controlli alle frontiere

Come precedentemente accennato, il Ministero della Salute effettua l'attività di controllo alle frontiere attraverso i propri Uffici territoriali, gli USMAF, ai quali spettano i controlli sui prodotti di origine non animale, e gli Uffici Veterinari Periferici, i PIF e gli UVAC.

Per quanto riguarda l'attività di controllo degli Uffici Veterinari Periferici, occorre distinguere fra l'attività dei P.I.F. relativa a partite di alimenti di origine animale, animali vivi e mangimi provenienti da Paesi Terzi, e l'attività degli UVAC relativa a partite di alimenti di origine animale e animali vivi provenienti dagli altri Paesi dell'Unione Europea.

Nel primo caso si tratta di un controllo obbligatorio, di carattere sistematico, cioè su ogni partita presentata per l'importazione, secondo regole comunitarie.

Nel secondo caso si tratta invece di un controllo documentale e di un controllo fisico a destino, non discriminatorio, effettuato su merci provenienti dagli altri Paesi dell'Unione.

Controllo ufficiale alle importazioni di prodotti di origine non animale

Gli USMAF, coordinati dal Ministero della Salute – DGSAN – Ufficio II, rappresentano i punti di entrata dei prodotti di origine non animale nel territorio nazionale.

I controlli ufficiali comprendono almeno un controllo documentale sistematico (esame dei documenti commerciali e, se del caso, dei documenti che, in base alla normativa, devono accompagnare la partita), un controllo di identità a campione (ispezione visuale per assicurare che i certificati o altri documenti di accompagnamento della partita coincidano con l'etichettatura e il contenuto della partita stessa) e, se del caso, un controllo materiale o fisico (controlli dell'alimento sui mezzi di trasporto, sugli imballaggi, sull'etichettatura e sulla temperatura, il campionamento a fini di analisi e prove di laboratorio, ecc.).

Ove non sussistano motivi di sospetto o altre ragioni cautelari, il campionamento è effettuato a sondaggio nella misura del 5% delle partite presentate o di cui si prevede l'arrivo nella settimana (DPR 14 luglio 1995)

Quando sia manifesto che alimenti importati da un Paese terzo possono comportare un grave rischio per la salute umana, la Commissione adotta condizioni particolari per l'alimento proveniente da tutto il Paese terzo o da parte del suo territorio (art. 53, comma 1, lettera b, del Reg. CE 178/2002).

Nel caso di micotossine, il Comitato Scientifico dell'Alimentazione Umana ha constatato che l'Aflatossina B_1 è una potente sostanza cancerogena genotossica che, anche a livelli minimi, accresce il rischio di cancro al fegato.

Rappresentando l'Aflatossina B_1 una minaccia per la salute pubblica nella Comunità, sono state adottate condizioni particolari a livello comunitario per l'importazione di particolari prodotti alimentari a rischio contaminazione da questa micotossina.

La Commissione europea ha quindi adottato la Decisione n. 2006/504/CE e s.m., che stabilisce condizioni particolari per l'importazione di determinati prodotti alimentari da alcuni Paesi terzi a rischio contaminazione da Aflatossine (Brasile, Cina, Egitto, Iran, Turchia).

In sintesi, sono oggetto della decisione le noci brasiliane dal Brasile, le arachidi da Cina e Egitto, i pistacchi dall'Iran, i fichi secchi, le nocciole e i pistacchi dalla Turchia, le mandorle dagli USA, nonché i relativi prodotti trasformati, composti, o contenenti una quantità rilevante degli stessi ($\geq$ 10%).

L'importazione di questi prodotti nella Comunità deve avvenire solo attraverso uno dei punti di entrata designati (PED) elencati nell'Allegato II della decisione. I punti di entrata designati in Italia sono:

- Ufficio di sanità, marittima, aerea e di frontiera (USMAF) Bari, Unità territoriale (UT) Bari,
- USMAF Bologna, UT Ravenna,
- USMAF Brindisi, UT Brindisi,
- USMAF Catania, UT Reggio Calabria,
- USMAF Genova, UT Genova,
- USMAF Genova, UT La Spezia,
- USMAF Genova, UT Savona,
- USMAF Livorno, UT Livorno,
- USMAF Napoli, UT Cagliari,
- USMAF Napoli, UT Napoli,
- USMAF Napoli, UT Salerno,
- USMAF Pescara, UT Ancona,
- USMAF Venezia, UT Trieste, compresa dogana di Fernetti-interporto Monrupino
- USMAF Venezia, UT Venezia.

Per l'importazione dei prodotti alimentati oggetto della decisione, le condizioni particolari da adottare per l'importazione possono così riassumersi:

- la partita deve essere accompagnata dai risultati del campionamento e delle analisi e dal certificato sanitario conforme al modello fornito in Allegato I della decisione, debitamente compilato e firmato da un rappresentante autorizzato dell'autorità competente del Paese di provenienza;
- è necessario un Documento Comune di Entrata (CED) conforme al modello fornito in Allegato III della decisione, attestante il completamento dei controlli ufficiali effettuati sui prodotti alimentari coperti dalla decisione;
- è stabilita una accresciuta frequenza dei controlli fisici (dal 5% al 100%).

La Decisione 2006/504/CE è stata recentemente modificata dal nuovo Reg. CE 669/2009 del 24 luglio 2009, relativo al livello accresciuto di controlli ufficiali sulle importazioni di alcuni mangimi e alimenti di origine non animale.

Il Reg. CE 669/2009, che si applicherà a decorrere dal 25 gennaio 2010, fissa le norme relative al livello accresciuto di controlli ufficiali conformemente alle disposizioni di cui all'art. 15, paragrafo 5, del Reg. CE n. 882/2004, nonché stabilisce un elenco di mangimi e alimenti di origine non animale che, sulla base dei rischi noti o emergenti, deve essere oggetto di un livello accresciuto di controlli ufficiali nel punto di entrata designato (Allegato I).

La Tabella 4 evidenzia i mangimi e gli alimenti di origine non animale che devono essere oggetto di un livello accresciuto di controlli ufficiali nel punto di entrata designato per quanto riguarda il rischio Aflatossine.

Sempre in relazione al rischio Aflatossine, la Commissione ha anche emanato la Decisione 2008/47/CE, che approva i controlli pre-esportazione effettuati dagli USA sulle arachidi e i prodotti derivati per quanto riguarda la presenza di Aflatossine.

Nell'ambito dei controlli ufficiali effettuati dagli Uffici di Sanità Marittima ed Aerea nell'anno 2008, per i prodotti di origine non animale, si evince come il controllo sulle micotossine incida per quasi la metà dei controlli analitici totali, in particolare per le Aflatossine, spesso riscontrate sulla frutta secca di origine o di provenienza nota.

Come già accennato, la Decisione 2006/504/CE e successive modifiche ha individuato i Paesi Terzi dai quali provengono i prodotti alimentari di origine non animale a rischio di contaminazione, ha individuato i prodotti soggetti a controlli accresciuti, ha definito la percentuale di campionamento obbligatoria per ognuno di essi ed ha indicato la documentazione che deve accompagnare obbligatoriamente la merce.

Tabella 4. Rischio micotossine: mangimi e alimenti di origine non animale oggetto di un livello accresciuto di controlli ufficiali nel punto di entrata designato

Mangimi e alimenti (uso previsto)	Paese di origine	Rischio	Frequenza dei controlli fisici e d'identità (%)
Arachidi e prodotti derivati (alimenti e mangimi)	Argentina	Aflatossine	10
	Brasile	Aflatossine	50
	Ghana	Aflatossine	50
	India	Aflatossine	10
	Vietnam	Aflatossine	10
Spezie	India	Aflatossine	50
Semi di melone e prodotti derivati	Nigeria	Aflatossine	50
Uve secche (alimenti)	Uzbekistan	Ocratossina A	50
Riso Basmati destinato al consumo umano diretto	Pakistan	Aflatossine	50
	India	Aflatossine	10

Inoltre, su indicazione di ogni Stato Membro, sono stati indicati i punti di ingresso dei prodotti alimentari oggetto di controlli accresciuti.

Recentemente la Decisione 504/2006/CE è stata aggiornata e modificata e la nuova versione andrà in vigore dal 1° gennaio 2010.

In base invece, all'art. 15 punto 5 del Reg.CE 882/2004, nel luglio di quest'anno è stato emanato il nuovo Reg. CE 669/2009 che entrerà in vigore a partire dal 25 Gennaio 2010, che prevede un'attività di controllo accresciuto alle importazioni su alcuni mangimi e prodotti di origine non animale.

I prodotti alimentari inseriti nell'Allegato I di tale regolamento, sono stati identificati in base a criteri ben definite (n. allerte, ispezioni FVO, ecc.). La lista è dinamica e viene aggiornata ogni tre-sei mesi.

Il controllo effettuato nell'anno 2008 per la ricerca delle micotossine sui prodotti alimentari individuati, è stato reso possibile grazie alla piattaforma informatica NSIS-USMAF.

Tale sistema informativo sanitario è un sistema informatizzato e su web con il quale gli Uffici acquisiscono i dati dell'importazione e rilasciano l'atto finale con il quale si consente la nazionalizzazione della merce (NOS) o il respingimento (Non ammissione).

Tale sistema consente agli uffici centrali di avere in tempo reale moltissimi dati relativi alle importazioni, utili anche ai fini della rintracciabilità.

Il sistema N-SIS ci consente inoltre di :

- verificare in tempo reale tutte le merci di interesse sanitario in entrata in Italia;
- effettuare ricognizioni su periodi temporali, matrici di merci, produttori esteri, importatori, destinatari, punti di ingresso;
- effettuare statistiche e studi in risposta a richieste della Commissione europea;
- evidenziare criticità operative per una migliore organizzazione del servizio.

Piano Nazionale Integrato

L'attività di controllo delle micotossine, come tutte le attività di controllo ufficiale, è inclusa nel Piano Nazionale Integrato (PNI o MANCP), previsto dagli art. 41-44 del Reg. CE 882/2004, al fine di garantire l'effettiva attuazione dell'art.17 (2) del Reg. CE 178/2002 e delle norme sulla salute e sul benessere degli animali.

Il Piano Nazionale Integrato deve rispondere ad alcuni requisiti di riferimento e, in particolare, deve essere:

- *unico*
  cioè deve descrivere la struttura generale del sistema nazionale di sicurezza e prevenzione, gli obiettivi strategici, i criteri delle azioni, le risorse umane;
- *coerente, completo e integrato*
  al fine di: migliorare il sistema incrociato di analisi tra i controlli ufficiali effettuati dalle differenti autorità competenti in tutti i settori e a tutti i livelli della catena alimentare e dei mangimi; identificare le eventuali sovrapposizioni o l'assenza di controlli; assicurare l'efficacia e l'efficienza del sistema di controllo uficiale;
- *basato sulla valutazione e categorizzazione del rischio*
  al fine di assicurare il coordinamento sulla valutazione del rischio sono state nominate la Commissione Strategica Nazionale e la Commissione Nazionale per la Sicurezza alimentare (Decreto del 26/10/2007, Organizzazione delle funzioni di cui al Reg. CE 178/2002);
- *pluriennale*
  attualmente è in vigore un Piano quadriennale (PNI 2007-2010);
- *aggiornato annualmente.*

PIANO PLURIENNALE DI VIGILANZA E SORVEGLIANZA SULL'ALIMENTAZIONE ANIMALE – SOSTANZE INDESIDERABILI E ALTRI CONTAMINANTI: MICOTOSSINE

Gaetana Ferri
Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e Sicurezza degli Alimenti, Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario, Ministero della Salute, Roma

Introduzione

Il Ministero del Lavoro della Salute e delle Politiche Sociali, e nello specifico la Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario (DGSA), ha emesso, annualmente fino all'anno 2008, il Piano Nazionale sull'Alimentazione degli Animali (PNAA) che, a partire dall'anno 2009, diventa un piano nazionale di sorveglianza e vigilanza sanitaria sull'alimentazione degli animali (1) con valenza triennale al fine di adeguarsi alle disposizioni di cui all'art. 42 del Reg. CE 882/2004 (2) sui controlli ufficiali per la verifica della conformità alle leggi degli alimenti e dei mangimi e alle disposizioni sulla salute e sul benessere animale, che prevede, invece, la stesura di piani di controllo nazionali pluriennali.

In particolare, il Reg. CE 882/2004 stabilisce che i controlli ufficiali siano effettuati periodicamente, con frequenza appropriata, prendendo in considerazione i rischi identificati associati agli animali, agli stabilimenti e a tutte le attività di produzione del settore mangimi, nonché all'uso dei mangimi che potrebbero incidere sulla sicurezza del mangime, sulla salute e benessere degli animali, e inoltre, considerando i risultati emersi dai precedenti controlli in merito al rispetto della normativa comunitaria da parte degli operatori del settore mangimi (OSM) e tutte le informazioni a disposizione indicative di situazioni di non conformità.

Gli obiettivi dei controlli ufficiali, così come definiti dall'art. 10 del Reg. CE 882/2004, possono essere raggiunti attraverso appropriati metodi e tecniche di controllo quali il monitoraggio, la sorveglianza, le verifiche, le *audit*, le ispezioni, i campionamenti e le analisi.

Il piano, quindi, nell'ottica degli scopi del regolamento, diventa un utile strumento strategico per la gestione dei controlli promuovendo un approccio coerente e coordinato in tutti gli stadi della catena di produzione, incluse le attività di importazione e introduzione (cfr definizione art.2 Reg. CE 882/2004), identificando le priorità in funzione dei rischi e i criteri per definire la categoria di rischio delle diverse attività del settore nonchè le procedure di controllo, indicando le fasi nella produzione del mangime significativi al fine della verifica della conformità alle disposizioni legislative, incoraggiando l'adozione delle buone pratiche a tutti i livelli del sistema di controllo nonché controlli efficaci sul sistema di tracciabilità.

Esso contiene informazioni sulla struttura e organizzazione del sistema di controlli ufficiali, ossia le modalità secondo cui l'Autorità centrale e le Autorità regionali/locali, insieme ad appositi Organi di controllo, verificano il rispetto delle disposizioni di legge relative ai mangimi lungo l'intera filiera produttiva al fine di armonizzare la gestione dei controlli a livello territoriale, nonché le strategie da adottare in caso di situazioni non conformi alle disposizioni di legge e garantire, quindi, un elevato livello di protezione della salute umana, animale e dell'ambiente.

Tale piano non è statico, bensì dinamico, in quanto soggetto ad un continuo aggiornamento al fine di conformarsi a nuove normative e orientamenti comunitari, ai nuovi sviluppi scientifici, ai risultati dei controlli comunitari effettuati sul territorio nazionale, nonché alle *audit* di settore svolte sul territorio e, eventualmente, alle disposizioni derivanti da nuove emergenze o rischi sanitari e dai precedenti controlli ufficiali.

L'attuazione del piano nazionale di controllo si realizza attraverso la stesura dei Piani di controllo definiti dalle Regioni e dalle Province autonome, anch'essi di durata triennale, su indicazione di quanto definito nel Piano nazionale e basati su un'attività di sorveglianza e un'attività di vigilanza che coinvolge le Autorità centrali, regionali e locali, nonché i Centri di referenza nazionali e i Laboratori nazionali di riferimento.

L'attività di sorveglianza consiste, come da definizione del Reg. CE 882/2004, "nell'osservazione approfondita di una o più aziende del settore dei mangimi e degli alimenti, di operatori del settore dei mangimi e degli alimenti, oppure delle loro attività". Ne consegue che la sorveglianza include la raccolta di dati e la loro analisi, la relativa interpretazione al fine di valutare l'evoluzione nel tempo di un determinato fenomeno, in riferimento a requisiti predefiniti e che permette, di conseguenza, la valutazione delle misure di controllo adottate e dell'incidenza di queste sul fenomeno, nonché una riprogrammazione delle azioni.

L'attività di vigilanza si prefigge un controllo mirato nella verifica della conformità alla normativa in materia di mangimi, secondo quanto riportato agli art. 3 e 10 del Reg. CE 882/2004, dopo aver considerato i rischi associati a qualunque stadio del sistema di produzione del mangime, le informazioni ottenute sulla conformità degli OSM alle disposizioni sui mangimi, dati su altre situazioni non conformi, l'affidabilità dei propri controlli; quindi, rispetto alla precedente tipologia di attività, il controllo ufficiale dei mangimi risulta finalizzato ad obiettivi più specifici.

Descrizione del PNAA 2009-2011

Il piano è suddiviso in tre sezioni principali: una parte generale descrittiva ove sono enunciate le finalità, le competenze, la programmazione delle attività regionali e la normativa di riferimento inclusi gli interventi ispettivi per la verifica della conformità degli OSM; una parte tecnico-applicativa dove sono descritti i programmi di campionamento riferiti a particolari sostanze da ricercare nei mangimi e raggruppate in sei diversi capitoli (Piani di sorveglianza e vigilanza sulla BSE, sugli additivi, sulle sostanze indesiderabili, sulla contaminazione da salmonella, sui prodotti contenenti Organismi Geneticamente Modificati (OGM), sui controlli relativi ai mangimi di importazione); una terza parte che raccoglie la modulistica di diverso tipo ad es. moduli dei verbali di campionamento, moduli dei verbali per i sopralluoghi ispettivi, moduli dei provvedimenti intrapresi in caso di non conformità presso gli OSM, indicazioni per la classificazione del rischio degli stabilimenti, per la buona pratica di campionamento e per la stesura della relazione annuale da trasmettere, da parte delle Regioni, al Ministero.

Nello specifico, alla stesura dei programmi di campionamento, di cui nella parte tecnica del piano, collaborano gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) in qualità di Centri di Referenza Nazionale, per i vari argomenti pertinenti, e ovviamente l'Istituto Superiore di Sanità per quanto di competenza nel settore dei "contaminanti" e quindi per le micotossine di cui è il Laboratorio Nazionale di Riferimento. In particolare al capitolo 3 intitolato " Piano di sorveglianza e di vigilanza della presenza delle sostanze indesiderabili e dei contaminanti negli alimenti per animali", la sezione 3.b) è quella dedicata alle "micotossine".

Sostanze indesiderabili e di altri contaminanti nei prodotti destinati all'alimentazione animale: micotossine

La contaminazione da micotossine ha suscitato particolare attenzione sull'alimentazione animale anche a seguito dei pareri dell'EFSA (*European Food Safety Authority*) (3-6) relativi a specifiche micotossine (Deossivalenolo, Zearalenone, Ocratossina, Fumonisine) considerate tossiche per alcune specie animali evidenziando, contestualmente, la necessità di raccogliere dati al fine di una più approfondita valutazione e di legiferare in proposito.

Alla Direttiva 2002/32/CE (7) sulle sostanze indesiderabili nell'alimentazione animale (recepita con DL.vo n. 104 del 10 maggio 2004) (8) che si limita a definire il massimo contenuto (mg/kg) di Aflatossina B_1 in diversi prodotti (materie prime, mangimi completi e complementari) specificando, fra l'altro, la tipologia di specie di destinazione, sono seguite molteplici raccomandazioni comunitarie su specifiche micotossine attraverso le quali il legislatore si è prefisso determinati obiettivi, come di seguito riportato, all'interno della Comunità.

La Raccomandazione 2005/925/CE (9), evidenziando la mancanza sul territorio comunitario di regolamentazione per alcune micotossine (Ocratossina A, Zearalenone, Deossinivalenolo, Fumonisine e Tossine T-2 e HT-2), ha sollecitato ciascuno Stato Membro alla raccolta di informazioni, tramite un programma coordinato di controllo, per verificare le concentrazioni delle suddette micotossine nei mangimi e le relative metodiche analitiche effettuando campionamenti casuali e mirati rivolti, questi ultimi, alle materie prime per mangimi in cui si ritiene possibile la presenza di concentrazioni elevate di micotossine, ad esempio cereali, semi oleosi e relativi prodotti e sottoprodotti, nonché materie prime per mangimi immagazzinati per un lungo periodo o trasportati via mare per lunghe distanze.

Anche la Raccomandazione 2006/576/CE (10) (il cui limite per l'Ocratossina A è stato recepito con DM 15 maggio 2006) relativa alla presenza di Deossinivalenolo, Zearalenone, Ocratossina A, Tossine T-2 e HT-2 e Fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali, invita gli Stati Membri, attraverso un maggior coinvolgimento degli operatori del settore mangimi, ad incrementare il monitoraggio delle suddette sostanze nei cereali e nei prodotti a base di cereali utilizzati nell'alimentazione degli animali e a trasmettere regolarmente alla Commissione i risultati analitici ottenuti al fine dell'inserimento in una banca dati che permette di dare una visione complessiva sullo stato della contaminazione da micotossine. Al fine di permettere, inoltre, alle Autorità degli Stati Membri di giudicare l'accettabilità di mangimi composti (1) e delle materie prime (2), la raccomandazione riporta i valori di riferimento (da intendersi quali limiti superiori in quanto definiti per le specie meno sensibili), per alcune micotossine, di cui nella Tabella 1.

In base alle disposizioni normative sui prodotti destinati all'alimentazione animale supportate, inoltre, dalle molteplici normative comunitarie relative a prodotti destinati all'alimentazione umana (alimenti) come ad es. il Reg. CE 1881/2006 (11) che definisce le concentrazioni massime per alcuni contaminati negli alimenti e nello specifico il limite per l'Aflatossina M1 nel latte (crudo, trattato per riscaldamento e per il latte destinato a prodotti a base di latte) pari a 0,05 μg/kg, oppure il Reg. CE 1126/2007 (12), modifica del precedente, che definisce le concentrazioni massime di alcuni contaminanti negli alimenti e in particolare per le fusariotossine (incluso il DON), la parte tecnica del PNAA ha previsto l'attività di controllo sulla contaminazione da micotossine nell'ambito dei piani di sorveglianza e vigilanza.

Tabella 1. Valori di riferimento per alcune micotossine secondo le normative europee

Micotossina	Prodotti destinati all'alimentazione degli animali	Valore di riferimento in mg/kg (ppm) di mangime al tasso di umidità del 12%	Fonte normativa
Deossinivalenolo (DON)	*Materie prime (2) per mangimi*		
	- Cereali e prodotti a base di cereali, eccetto i sottoprodotti del granoturco	8	
	- Sottoprodotti del granoturco	12	
	Mangimi complementari (3) e completi (4)	5	Racc. 2006/576/CE
	Ad eccezione di:		
	- mangimi complementari e completi per suini	0,9	
	- mangimi complementari e completi per vitelli (< 4 mesi), agnelli e capretti	2	
	(1),(2),(3), (4) per le definizioni cfr art. 3 Reg. CE 767/2009		
Zearalenone (ZEA)	*Materie prime per mangimi*		
	- Cereali e prodotti a base di cereali, eccetto i sottoprodotti del granoturco	2	Racc. 2006/576/CE
	- Sottoprodotti del granoturco	3	
	Mangimi complementari e completi		
	- per suini e scrofette (giovani scrofe)	0,1	
	- per scrofe e suini da ingrasso	0,25	
	- per vitelli, bovini da latte, ovini,(inclusi agnelli) e caprini (inclusi capretti)	0,5	
Ocratossina A (OTA)	*Materie prime per mangimi*		
	- Cereali e prodotti a base di cereali	0,25	Racc. 2006/576/CE
	Mangimi complementari e completi		
	- per suini	0,05	DM 15/5/2006
	- per pollame	0,1	
Fumonisine B1+B2	*Materie prime per mangimi*		
	- Granoturco e prodotti derivati	60	
	Mangimi complementari e completi		
	- per suini, equini *(Equidi*), conigli e animali da compagnia	5	Racc. 2006/576/CE
	- per pesci	10	
	- per pollame, vitelli (<4 mesi), agnelli e capretti	20	
	- per ruminanti adulti (> 4 mesi) e visoni	50	

Piano di sorveglianza

Il Piano di sorveglianza si avvale di un campionamento statisticamente rappresentativo distribuito in modo uniforme e casuale conseguente alla necessità di rivelare possibili fonti di rischio emergenti o ri-emergenti in siti specifici come per esempio le aziende produttrici di

materie prime o di mangimi destinati agli animali da latte in quanto rappresentativi di una maggiore quota di rischio.

Tra le materie prime il mais è da considerarsi il cereale più a rischio per la contaminazione da micotossine in considerazione della possibilità della presenza contemporanea di diverse micotossine a concentrazioni tali da costituire fonte di rischio per gli animali e per l'uomo nel caso di trasferimento delle tossine agli alimenti di origine animale.

Nell'ambito della sorveglianza il piano, dunque, si prefigge molteplici obiettivi al fine di ottenere una stima dei livelli di contaminazione sul territorio nazionale:

a) la definizione un programma di campionamento omogeneo sul territorio al fine di verificare l'eterogeneità regionale al rischio di contaminazione da micotossine;

b) la definizione dello stato di contaminazione da micotossine non normate su materie prime finalizzata ad evidenziare prevalenze riferibili a specifiche produzioni utilizzate in aree geografiche più suscettibili a rischio;

c) la valutazione la compresenza di più micotossine nello stesso campione per raccogliere informazioni su potenziali effetti tossici derivanti dall'azione sinergica di più micotossine nello stesso campione;

d) la ricerca su campioni di avena e grano, e sui mangimi contenenti tali materie prime, la presenza di Tossine T-2 e HT-2 al fine di definire lo stato di contaminazione per tali tossine a livello nazionale.

   Dato che allo stato attuale non sembra essere disponibile un metodo di analisi affidabile in termini di ripetibilità, riproducibilità e di accuratezza, si è proposto l'utilizzo dei una metodo di screening quantitativo basato sulla tecnica ELISA *(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)*;

e) l'esecuzione di controlli, limitatamente alla ricerca e determinazione di Aflatossina B_1 e Ocratossina A su alimenti destinati agli animali da compagnia (cani e gatti).

Le informazioni così ottenute permettono di definire una mappatura del rischio sul territorio al fine di fornire risposte immediate a situazioni di allarme nel caso in cui la contaminazione dovesse estendersi anche a prodotti di origine animale destinati all'alimentazione umana.

Con lo scopo di ottenere informazioni attendibili e rappresentative della reale situazione sul territorio è stato definito il criterio di ripartizione dei campioni in ambito regionale (Tabella 2) basato sulla rappresentatività delle produzioni su base geografica e su una scelta casuale delle aziende produttrici di mangimi e di materie prime.

Nell'ottica degli obiettivi di tale piano si è stabilito di scegliere quali stabilimenti oggetto di campionamento quelli adibiti: a) alla produzione di materie prime e mangimi destinati agli animali da latte e b) alla distribuzione e produzione di mangimi per animali da compagnia, e infine c) quelli agricoli e zootecnici; e fra le matrici da campionare, presso i medesimi stabilimenti, le seguenti:

- materie prime (mais, sottoprodotti del mais, grano, altri cereali e loro prodotti e sottoprodotti);
- mangimi destinati al bestiame da latte (per la ricerca di Aflatossina B_1, Ocratossina A, Zearalenone, Deossinivalenolo, Fumonisine);
- mangimi complementari e completi;
- mangimi per animali da compagnia (cane e gatto) per la ricerca di Aflatossina B_1 e Ocratossina A;
- materie prime (avena, grano) e mangimi complementari o completi che le contengono per la ricerca delle Tossine T-2 e HT-2.

Tabella 2. Numero campioni, diviso per regioni e per matrici secondo il Piano di sorveglianza relativo alle micotossine

Regione	Materie prime e mangimi per animali da reddito	Mangimi per animali da compagnia	Avena, grano e mangimi (con avena e grano)	Totale campioni
Abruzzo	60	3	6	69
Basilicata	60	3	5	68
Bolzano	30	3	3	36
Calabria	60	3	6	69
Campania	60	8	10	78
Emilia Romagna	60	11	81	152
Friuli-Venezia Giulia	60	3	9	72
Lazio	60	6	9	75
Liguria	60	3	4	67
Lombardia	60	35	56	151
Marche	60	3	8	71
Molise	60	3	5	68
Piemonte	60	16	53	129
Puglia	60	3	7	70
Sardegna	60	3	10	73
Sicilia	60	4	10	74
Toscana	60	7	22	89
Trento	30	3	3	36
Umbria	60	9	23	92
Valle d'Aosta	60	3	3	66
Veneto	60	20	67	147
Totale	1200	152	400	1752

Piano di vigilanza

Il piano di vigilanza rappresenta una verifica, lungo l'intera catena agro-alimentare e zootecnica, della conformità ai limiti massimi stabiliti dalle normative vigenti, basata sull'analisi del rischio, per quelle micotossine aventi maggiore importanza da un punto di vista sanitario (Aflatossine, Ocratossine e Fumonisine), con un verifica quantitativamente più consistente nelle regioni che possono rappresentare una probabilità di rischio maggiore per il benessere degli animali.

La numerosità campionaria risulta basata su una correlazione fra il rischio di contaminazione, le diverse realtà produttive e la relativa numerosità.

In particolare, nella definizione del programma di campionamento si dovrà considerare la diretta correlazione tra clima e contaminazione da micotossine e anche la diversa natura delle micotossine (tossine da campo e tossine da stoccaggio).

In base a quanto sopra riportato si rende necessario il prelievo di campioni di prodotti in cui verificare la contaminazione da Aflatossina B_1 e Ocratossina presso i centri di stoccaggio o negli allevamenti con riserve di mangime o di materia prima; mentre campioni di prodotti potenzialmente contaminati da fusariotossine (tossine da campo) dovrebbero essere prelevati in qualsiasi sito dopo l'essiccazione, non essendo praticabile il campionamento in campo.

Per le prime due micotossine, inoltre, sarà verificata la conformità alle normative vigenti, prevedendo pertanto anche la possibilità di ricorrere alle analisi di revisione, per le altre micotossine si terrà conto dei limiti di cui alla Raccomandazione 2006/576/CE e spetterà alle Aziende Sanitarie Locali individuare, eventualmente, le destinazioni d'uso dei prodotti contaminati verso le specie animali meno sensibili (es. ruminanti) alle relative micotossine.

In particolare sarà necessario disporre di un maggior numero di campioni di materie prime in cui ricercare l'Aflatossina B_1, e di campioni di mais e grano per la ricerca del DON; mentre, negli allevamenti di suini, essendo la specie animale più sensibile, dovrà essere incrementato il numero di campioni per la ricerca dell'Ocratossina A; negli stabilimenti adibiti alla produzione di mangimi per equini e bovini sarà necessario prelevare un maggior numero di campioni per la ricerca, rispettivamente delle Fumonisine e dello Zearalenone.

In funzione di quanto definito negli obiettivi si definisce il criterio di ripartizione dei campioni in ambito regionale (Tabella 3) considerando, per le motivazioni sopra riportate, un campionamento mirato presso i seguenti impianti:

- mangimifici a scopo commerciale;
- depositi e aree di commercio all'ingrosso di granaglie e mangimi (da privilegiare);
- essiccatoi;
- importatori (da privilegiare);
- aziende zootecniche;

e per le seguenti tipologie di matrici:

- materie prime (mais e relativi sottoprodotti, grano, altri cereali, semi, frutti oleaginosi o loro prodotti e sottoprodotti);
- materie prime per mangimi immagazzinate per lunghi periodi o importate via mare per lunghi periodi/lunghe distanze;
- mangimi per bovini da latte;
- mangimi per bestiame da latte diverso dai bovini;
- mangimi per suini;
- mangimi complementari o completi.

Tabella 3. Numero di campioni per il piano di vigilanza sulla contaminazione da micotossine (Aflatossina B_1, Ocratossina A, Zearalenone, Deossinivalenolo, Fumonisine)

Regione	N. campioni per Regione
Abruzzo	30
Basilicata	15
Bolzano	40
Calabria	20
Campania	30
Emilia Romagna	80
Friuli-Venezia Giulia	80
Lazio	40
Liguria	15
Lombardia	80
Marche	20
Molise	10
Piemonte	80
Puglia	40
Sardegna	10
Sicilia	20
Toscana	30
Trento	40
Umbria	10
Valle d'aosta	10
Veneto	80
Totale	780

Provvedimenti da adottare in caso di non conformità

Nel caso di riscontro di valori non conformi sui campioni prelevati si procederà nel modo seguente:

a) se i valori non conformi si riferiscono all'Aflatossina B_1, l'IZS comunica il risultato alla Azienda Unità Sanitaria Locale competente, che provvede ad un nuovo campionamento ufficiale delle materie prime costituenti la razione alimentare e dispone l'esecuzione dei controlli sulla produzione di latte e ogni altro adempimento previsto dalla normativa vigente. L'eventuale analisi di revisione sarà effettuata dall'Istituto Superiore di Sanità;
b) se i valori non conformi si riferiscono all'Ocratossina A, l'IZS comunica il risultato alla AUSL competente, che provvede al campionamento delle materie prime costituenti la razione alimentare. Il servizio veterinario della AUSL, sentito l'IZS in merito alla disponibilità di metodiche analitiche validate, dispone che, al momento della macellazione dei suini consumatori dell'alimento contaminato, venga eseguito il prelievo di campioni di carne suina (muscolo, fegato, reni ecc.) e prodotti derivati. L'eventuale analisi di revisione sarà effettuata dall'Istituto Superiore di Sanità;
c) nel caso di riscontro di elevati livelli di contaminazione di Zearalenone, Deossinivalenolo, Fumonisine e Tossine T-2 e HT-2: l'IZS comunica il risultato alla ASL competente che, eventualmente, a seguito di un'analisi del rischio, dispone di destinare l'alimento contaminato alle specie meno sensibili.

Il Reg. CE 178/2002 (13), considera a rischio i mangimi, nei seguenti casi:

- se hanno un effetto nocivo per la salute umana o animale;
- se mettono a rischio, per il consumo umano, l'alimento ottenuto dall'animale destinato alla produzione alimentare.

In virtù di ciò esso stabilisce che i mangimi a rischio non possono essere immessi sul mercato né essere somministrati ad animali destinati alla produzione alimentare.

Tali misure sono conformi a quanto previsto dall'articolo 17, comma 1 della Legge 281/1963 (14) in base al quale, in caso di contaminazioni che non permettano di considerare il mangime di qualità sana, leale e mercantile, e che rappresenta un pericolo per la salute degli animali e umana, non possono essere immessi sul mercato e pertanto non possono essere somministrati ad animali destinati alla produzione alimentare.

Bibliografia

1. Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali. *PNAA 2009-2010-2011. Piano Nazionale di sorveglianza e di vigilanza sanitaria sull'Alimentazione degli Animali.* Roma: Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali; 2009. Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_942_allegato.pdf; ultima consultazione 31/8/2010.
2. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 882/2204 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali. *GUCE* L 191*,* 28 maggio 2004.
3. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to Deoxynivalenol as undesirable substance in animal feed, adopted on 2 June 2004. *The EFSA Journal* 2004;73:1-42.
4. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to Zearalenone as undesirable substance in animal feed, adopted on 28 July 2004. *The EFSA Journal* 2004;89:1-35.

5. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to Ochratoxin A as undesirable substance in animal feed, adopted on 22 September 2004. *The EFSA Journal* 2004;101:1-36.
6. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to Fumonisins as undesirable substance in animal feed, adopted on 22 June 2005. *The EFSA Journal* 2005;235:1-32.
7. Unione Europea. Direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 7 maggio 2002 sulle sostanze indesiderabili nell'alimentazione animale. *GUCE* L 140/1*,* 30 maggio 2002.
8. Italia. Decreto legislativo 10 maggio 2004, n.149. Attuazione delle direttive 2001/102/CE, 2002/32/CE, 2003/57/CE, 2003/100/CE, relative alle sostanze ed ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 139, 16 giugno 2004.
9. Unione Europea. Raccomandazione della Commissione del 14 dicembre 2005 (2005/925/CE) relativa al programma coordinato di ispezioni nel settore della nutrizione animale per l'anno 2006 in accordo alla Direttiva del Consiglio 95/53/CE. *GUCE* L 337/51*,* 22 dicembre 2005.
10. Unione Europea. Raccomandazione della Commissione del 17 agosto 2006 (2006/576/CE) sulla presenza di Deossinivalenolo, Zearalenone, Ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e Fumonisine inei prodotti destinati all'alimentazione animale. *GUCE* L 229/7, 23 agosto 2006.
11. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *GUCE* L364/5, 20 dicembre 2006.
12. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 1126/2007 della Commissione, del 28 settembre 2007, che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le Fusarium -tossine nel granoturco e nei prodotti a base di granoturco. *GUCE* L 255*,* 29 settembre 2007.
13. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 28 gennaio 2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. *GUCE* L 31*,* 1 febbraio 2002.
14. Italia. Legge 15 febbraio 1963, n. 281. Disciplina della preparazione e del commercio dei mangimi. *Gazzetta Ufficiale-Serie Generale* n. 82, 26 marzo 1963.

CONTROLLO UFFICIALE DI MICOTOSSINE IN DERRATE ALIMENTARI DI PROVENIENZA EXTRA-EUROPEA IN INGRESSO DAL PORTO DI RAVENNA

Maria Ferrari (a), Angela Guerrini (b), Davide Verna (b), Ivan Scaroni (b), Valerio Strocchi (b), Luciano Calò (c), Michele Buonaiuto (c), Giuseppe Marrali (c), Raffaella Patricelli (c), Raffaella Perfetti (c)
(a) Agenzia regionale per la prevenzione e l´ambiente ARPA Emilia Romagna, Sezione Provinciale di Bologna, Bologna
(b) Agenzia regionale per la prevenzione e l´ambiente ARPA Emilia Romagna, Sezione Provinciale di Ravenna, Ravenna
(c) Ufficio di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera USMAF Bologna, Unità territoriale di Ravenna, Ravenna

Introduzione

Ravenna è uno dei tredici punti di ingresso, presenti in Italia, per l'importazione sul territorio nazionale e comunitario di alimenti e mangimi provenienti da paesi extra-europei (1).

L'Ufficio di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera (USMAF) di Bologna - Unità territoriale di Ravenna, quale articolazione periferica del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali esercita funzioni, in ambito portuale e aeroportuale, di vigilanza e controllo su passeggeri e merci in arrivo dai paesi extra-europei. I laboratori di ARPA (Agenzia regionale per la prevenzione e l´ambiente) Emilia Romagna operano a livello regionale per l'esecuzione degli accertamenti analitici finalizzati al controllo ufficiale di alimenti e bevande, verificandone la conformità alla normativa comunitaria.

I principali prodotti alimentari che transitano attraverso il porto di Ravenna sono: cereali, frutta a guscio (arachidi, pistacchi, nocciole, ecc.), frutta secca (fichi secchi, uva sultanina, albicocche, ecc.), spezie, vegetali freschi (frutta e verdura), legumi, oli e grassi vegetali, prodotti trasformati (frutta e verdura conservate, succhi e puree di frutta, sfarinati, ecc.).

Su queste derrate i parametri chimici più frequentemente ricercati sono: micotossine, residui di fitofarmaci, metalli pesanti, additivi, organismi geneticamente modificati e caratteristiche di composizione.

In questo lavoro viene esaminato il flusso di alimenti sottoposti a controllo per la ricerca di micotossine, provenienti da paesi extra-europei, negli anni 2001-08, prelevati da personale USMAF presso il porto di Ravenna e analizzati dal Laboratorio Integrato ARPA, Sezione Provinciale di Ravenna.

Materiali e metodi

Il campionamento di alimenti destinati alla ricerca di micotossine viene eseguito dal personale tecnico USMAF in base alle procedure stabilite dal Reg. CE 401/2006 (2). La merce all'interno di un container trasportato via nave può essere sfusa, o contenuta in 600-700 sacchi da 25-30 kg, o in una dozzina di sacchi da 650 kg (*big bag*). Nel caso di merce sfusa si ricorre al campionamento in stiva, tramite l'utilizzo di sonde; nell'altro caso, il container viene svuotato e i sacchi di merce riposti in un magazzino, dove avviene il campionamento. Le partite di frutta a

guscio, e spesso quelle di frutta secca, sono maggiori di 15 t, pertanto viene prelevato un campione globale di 30 kg che è mescolato e suddiviso in 3 campioni di laboratorio, del peso di 10 kg ognuno. I 3 campioni di laboratorio, sigillati e accompagnati dal verbale di prelievo, sono consegnati alle strutture di ARPA che si occupano della loro omogeneizzazione e dell'esecuzione delle analisi.

Attualmente, sono a disposizione due tipologie di apparecchiature in grado di processare fino a 10-30 kg di prodotto garantendo un elevato grado di omogeneizzazione: un mulino a coltelli di tipo industriale, per la macinazione a secco e un mixer verticale con testa disintegrante ad immersione, per la macinazione ad umido (3-5).

Il laboratorio ARPA di Ravenna utilizza principalmente la tecnica di omogeneizzazione ad umido, raccomandata dalle linee guida redatte da organismi tecnici della comunità europea (SANCO/1208/2009) (6). La macinazione e omogeneizzazione dei campioni ad umido prevede la preparazione di un impasto semi-fluido (*slurry*) costituito dal campione finemente macinato in presenza di acqua, rispettando le proporzioni indicate in Tabella 1. Queste proporzioni sono indicative e possono variare in base alla capacità del campione di assorbire acqua.

Tabella 1. Rapporto ponderale campione/acqua per l'omogeneizzazione dei campioni con preparazione di *slurry*

Tipologia di campione	Campione/Acqua (p/p)
Pistacchi in guscio	1/1
Arachidi in guscio	1/2
Arachidi, nocciole, pistacchi senza guscio, fichi secchi	1/1 o 1/0,8
Mais,grano e orzo	1/1 o 1/1,5
Derivati di cereali (cracker, ecc.)	1/1 o 1/2

Il laboratorio Integrato ARPA opera con un sistema di gestione della qualità conforme alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, in ottemperanza alle disposizioni dell'art.12 del Reg. CE 882/2004 (7). La determinazione delle Aflatossine viene eseguita secondo quanto previsto dal metodo AOAC 999.07 (8), soggetto ad accreditamento SINAL e ISS. Il metodo soddisfa i criteri di rendimento fissati dal Reg. CE 401/2006 (2). Periodicamente sono effettuate prove di recupero. Il valore di recupero medio è utilizzato per la correzione del dato analitico, come richiesto dal Reg. CE 401/2006. Il dato è corredato dall'incertezza estesa di misura, ottenuta moltiplicando per un fattore 2 il valore dell'incertezza composta, a sua volta calcolata con il metodo di Horwitz. L'incertezza estesa è indispensabile ai fini della valutazione di conformità del dato analitico rispetto ai limiti fissati dal Reg. CE 1881/2006 (9). Infine, almeno una volta all'anno, per ogni tipologia di matrice di interesse, il laboratorio partecipa a circuiti interlaboratoriali, organizzati da FAPAS.

Risultati e discussione

In Tabella 2 si riportano i quantitativi delle principali categorie di merce in ingresso dal Porto di Ravenna, per le quali è previsto il controllo di micotossine, espressi in tonnellate, per gli anni 2006-2008 e per i primi otto mesi del 2009. L'importazione di queste derrate è legata alle attività produttive dell'industria alimentare; pertanto si registrano flussi di ingresso più intensi nel periodo invernale, in ragione del maggiore consumo di frutta a guscio e frutta secca. Nel corso degli anni è stato notato un calo dei quantitativi di merce, probabilmente dovuto a

fattori economici. In particolare, negli ultimi 12 mesi, la recente crisi mondiale ha avuto pesanti ripercussioni sull'attività del porto di Ravenna, con una ulteriore diminuzione delle quantità di merci transitate, specialmente di frutta secca e cereali.

Tabella 2. Quantità delle principali categorie di merci soggette a controllo di micotossine

Tipologia di merce	t/a (2006)	t/a (2007)	t/a (2008)	t/a (2009*)
Cereali	324.476	3.563.831	427.896	156.610
Frutta secca/a guscio	32.170	35.626	24.690	7.384
Spezie	99	81	19	105

(*) dati disponibili fino al 31/08/2009

In Tabella 3 e 4 sono riportati i campioni sui quali sono state ricercate le Aflatossine e l'Ocratossina A, suddivisi per tipologia di matrice, analizzati dal 2001 al 2008. I campioni sono stati classificati rispetto ai limiti di legge (Reg. CE 1881/2006) (9) come conformi (C) e non conformi (NC). Nella voce "altra frutta" sono compresi pinoli, noci, mandorle, armelline, anacardi e albicocche secche. I campioni di spezie ed erbe infusionali sono costituiti principalmente da pepe, peperoncino ed erbe aromatiche. Nella voce "cereali" sono compresi legumi e prodotti derivati.

Tabella 3. Numero di campioni conformi (C) e non conformi (NC) rispetto ai limiti di legge, analizzati negli anni 2001-2008, per la ricerca di Aflatossine

Anno	C o NC	Arachidi	Pistacchi	Nocciole	Fichi secchi	Altra frutta	Cereali	Spezie	Totale	% NC
2001	C	134	32	2	21	13	60*	6	208	/
	NC	1	13	0	5	0	0	0	19	10
2002	C	251	33	11	4	35	119*	19	353	/
	NC	2	10	0	0	0	1	1	14	4
2003	C	123	7	3	6	10	11	28	188	/
	NC	1	20	0	1	0	0	0	22	12
2004	C	100	2	28	15	37	23	15	220	/
	NC	6	7	0	0	0	0	0	13	6
2005	C	125	0	48	10	6	1	0	190	/
	NC	11	4	2	0	0	0	0	17	9
2006	C	63	1	51	13	20	2	0	150	/
	NC	21	1	6	1	0	0	0	29	19
2007	C	94	4	37	4	20	11	4	174	/
	NC	8	2	2	5	0	0	0	17	10
2008	C	60	2	27	3	12	8	3	115	/
	NC	17	4	4	3	1	0	0	29	25

*Sono compresi campioni di cereali destinati ad uso zootecnico

I campioni sui quali è stata effettuata la ricerca di Aflatossine (Tabella 3) sono più numerosi rispetto a quelli sui quali è stato determinato il contenuto di Ocratossina A (Tabella 4). Le altre micotossine (Deossinivalenolo, Zearalenone, Patulina) sono state ricercate solo su alcuni campioni di cereali e prodotti derivati dalle mele.

Tabella 4. Numero di campioni conformi analizzati negli anni 2001-2008, per la ricerca di Ocratossina A

Campione	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Uva sultanina	30	39*	16	18	20	13	9	9
Vino/birra	0	0	13	15	0	0	2	0
Frutta secca	0	0	7	0	6	5	1	1
Cacao/caffè e derivati	1	4	5	7	3	5	1	1
Cereali	1	1	0	1	0	0	9	7
Totale	32	44	41	41	29	23	22	18

* 2 NC

Arachidi, pistacchi e nocciole sono le matrici più frequentemente analizzate, rappresentano infatti il 60-80% dei campioni sui quali sono state ricercate le Aflatossine. In generale il maggior numero di non conformità è stato riscontrato in campioni di arachidi, nocciole, pistacchi e fichi secchi, in percentuali variabili nell'arco degli anni esaminati; inoltre dal 2004 sono drasticamente diminuiti i campioni di pistacchi, mentre sono aumentati quelli di nocciole. Relativamente a tali categorie si effettua un'analisi più approfondita sui risultati analitici ottenuti. Per quanto riguarda l'Ocratossina A, l'unica matrice sulla quale sono state riscontrate non conformità è l'uva sultanina nel 2002 (vedi Tabella 4).

In Figura 1a è riportato il numero di campioni di arachidi analizzati, suddivisi in conformi e non conformi, con le percentuali di questi ultimi. I campioni di arachidi sono sempre elevati (50-70% dei campioni per la ricerca di Aflatossine), si osserva tuttavia un calo delle partite di merce controllate: 132 campioni nel 2001, 250 nel 2002, 110-120 negli anni 2003-2005, circa 100 nel 2006 e 2007, solo 77 nel 2008. Sono cambiati, nel corso degli anni, i paesi di origine: Israele ed Etiopia sono i principali paesi di provenienza nel 2001; a partire dal 2002 si sono aggiunti Egitto e Cina; dal 2003 l'Egitto è il principale paese da cui provengono le derrate di arachidi. La percentuale di campioni non conformi è aumentata passando da 1% nel 2001 e 2002, a 6-8% nel 2004, 2005 e 2007; nel 2006 e 2008 si sono raggiunte percentuali di non conformità pari a 22-25%. La concentrazione di Aflatossina B_1 è aumentata. Negli anni 2001-2004 si sono in genere osservati livelli inferiori ai 10 μg/kg, mentre dal 2005 si sono presentati sempre più casi di contaminazioni a concentrazioni superiori a 30 μg/kg. L'aumento delle non conformità è stato riscontrato in coincidenza con l'applicazione, a partire dall'inizio del 2003, delle modalità di campionamento stabilite dalla Direttiva 98/53/CE, recepita in Italia dal DM 23/12/2000, e successivamente abrogata dal Reg. CE 401/2006 (2). Al contrario, fino al 2002, per ogni partita di merce veniva prelevato un unico campione di 2-3 kg. Queste tendenze indicano che le procedure definite dalla normativa comunitaria permettono di individuare un maggior numero di partite non conformi nonostante, nel corso degli anni, gli importatori abbiano messo in atto misure finalizzate a migliorare la qualità del prodotto, attraverso una più attenta selezione dei fornitori, un migliore controllo in loco del processo produttivo e la presentazione di un certificato di analisi al momento dell'importazione.

L'unico paese da cui provengono le nocciole è la Turchia. Il numero di campioni (Figura 1b) ha registrato un aumento, si passa da una decina di campioni nel 2002 fino a circa 50 campioni nel 2005 e 2006, per poi scendere a 25 campioni nel 2008. La percentuale di non conformità è al massimo 10% (anno 2008) e, come osservato per i campioni di arachidi, è aumentata negli ultimi anni.

In Figura 1c sono riportati i dati relativi ai pistacchi; Iran e Turchia sono i paesi da cui principalmente provengono questi prodotti. Nel 2009, sono stati analizzati per la prima volta prodotti provenienti dagli USA. Nel 2004 è stato osservato un drastico decremento dei campioni analizzati, imputabile, forse, ad un calo della domanda dell'industria alimentare, oppure alla scelta, da parte degli importatori, di un altro punto di ingresso. Le non conformità riguardano in

prevalenza i prodotti di origine iraniana, con una percentuale di non conformità sul totale dei campioni analizzati in 8 anni, del 40%. Solo tre campioni di provenienza turca sono risultati non conformi. Nel corso degli anni si evidenzia un'inversione nel rapporto conformità/non conformità: nei primi due anni considerati la percentuale di non conformità è intorno al 25%, successivamente sale al 74% nel 2003, al 78% nel 2004 fino ad arrivare al 100% nel 2005. Negli anni successivi, tale percentuale è calata, pur rimanendo elevata. Come osservato per le altre tipologie di campioni tale aumento è riconducibile all'applicazione delle procedure di campionamento previste dalla normativa comunitaria.

Il principale paese da cui provengono i fichi secchi è la Turchia. Il numero di campioni (Figura 1d) ha subito un decremento nel corso degli anni. Contrariamente a tale tendenza, a partire dal 2007 le non conformità sono aumentate sensibilmente, interessando il 50% dei campioni totali.
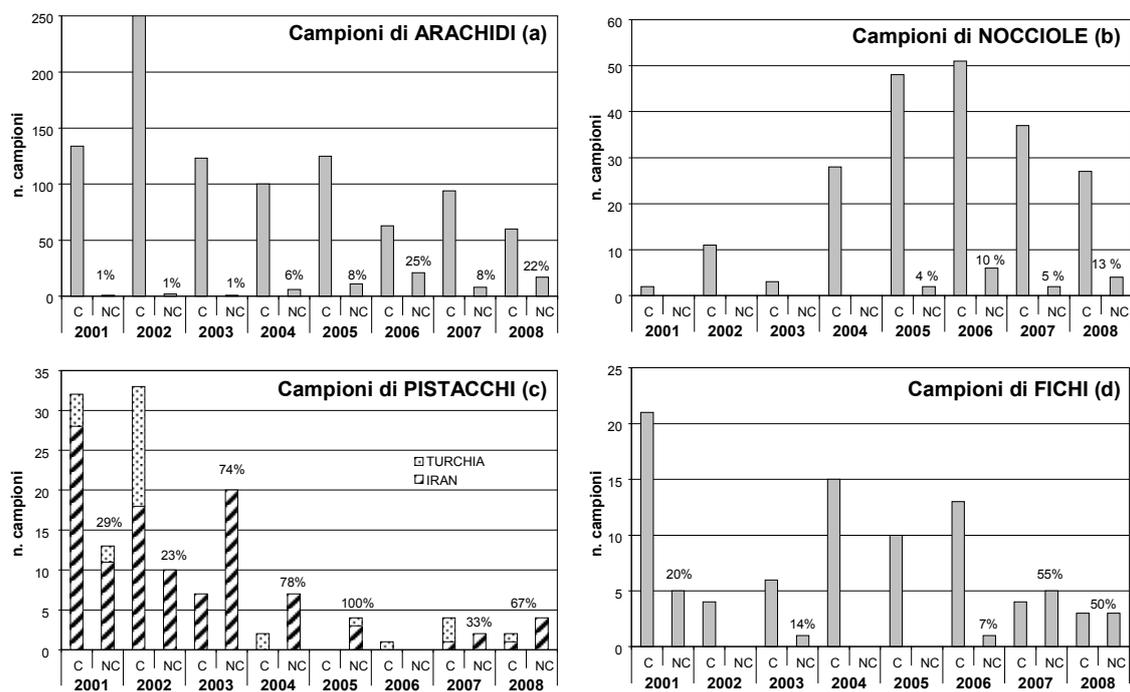
Figura 1. Campioni conformi (C) e non conformi (NC) di arachidi (a), nocciole (b), pistacchi (c) e fichi (d) analizzati nel periodo 2001-2008

Per approfondire le criticità legate all'eterogeneità della contaminazione da Aflatossine, sono stati raccolti i dati della concentrazione di Aflatossina B_1 nei campioni non conformi per il consumo umano diretto (limite di legge: 2 µg/kg) (9) analizzati nel 2008. Ogni campione rappresentativo di una partita di arachidi, pistacchi, o nocciole (campione globale) è costituito da tre campioni di laboratorio (due, nel caso dei fichi secchi); ciascun campione di laboratorio, del peso di 10 kg, è omogeneizzato e singolarmente analizzato, come descritto nella parte sperimentale. In Figura 2 sono riportate le concentrazione di Aflatossina B_1 nei tre campioni di laboratorio e la concentrazione nel campione globale, calcolata come media della concentrazione dei tre campioni di laboratorio. L'Aflatossina B_1 rappresenta in generale il principale contributo alle Aflatossine totali.
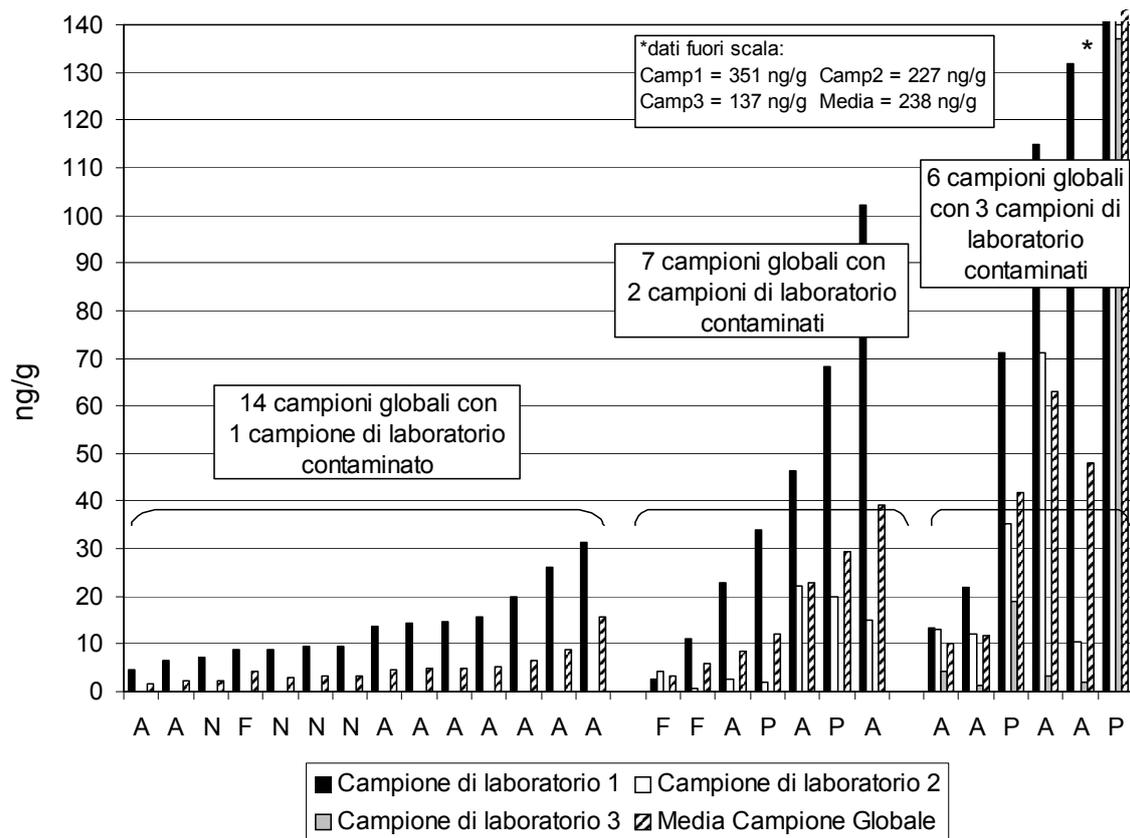
Figura 2. Concentrazione (ng/g) di Aflatossina B_1 nei tre campioni di laboratorio (anno 2008) e concentrazione media del campione globale (A = arachidi; N = nocciole; P = pistacchi; F = fichi)

Nel 2008 sono stati trovati 27 campioni globali non conformi, nei quali almeno uno dei tre campioni di laboratorio presenta una concentrazione di Aflatossina B_1 superiore, tenuto conto dell'incertezza di misura (3,6 ± 1,6 µg/kg), all'attuale limite di legge (2 µg/kg) (9) per la frutta a guscio e la frutta secca destinata al consumo umano diretto. Di questi 27 campioni 16 sono di arachidi, 4 di nocciole, 4 di pistacchi e 3 di fichi secchi.

14 campioni, cioè la metà dei 27 campioni non conformi, presentano solo 1 campione di laboratorio positivo, con concentrazioni di Aflatossina B_1 comprese tra 4,5 e 31 µg/kg. In 7 di questi 14 campioni la concentrazione di Aflatossina B_1 è inferiore a 10 µg/kg, in 5 è compresa tra 10 e 20 µg/kg, solo in 2 è superiore a 20 µg/kg. La concentrazione di Aflatossina B_1 nel campione globale, calcolata come media dei tre campioni di laboratorio, risulta inferiore a 5 µg/kg in 10 casi, compresa tra 5 e 10 µg/kg in 3 e superiore a 10 µg/kg in uno solo. Per 7 campioni globali (2 di fichi, 2 di pistacchi e 3 di arachidi) è stata trovata una concentrazione di Aflatossina B_1 superiore a 2 µg/kg in 2 campioni di laboratorio (si ricorda che nel caso dei fichi il campione globale è costituito da 2 soli campioni di laboratorio). Infine in 6 casi (4 di arachidi e 2 di pistacchi) tutti e tre i campioni di laboratorio sono risultati contaminati a concentrazioni superiori a 2 µg/kg.

Nei campioni che presentano 2 o 3 campioni di laboratorio contaminati, i livelli di concentrazione sono mediamente superiori rispetto a quelli con 1 solo campione contaminato;

tranne nel caso di un campione di fichi, è stato sempre trovato almeno un campione di laboratorio con valori di Aflatossina B_1 maggiori di 10 µg/kg, fino ad arrivare a contaminazioni molto elevate di 50-100 µg/kg. Di conseguenza anche i valori di contaminazione media del campione globale sono spesso superiori a 10 µg/kg.

Considerando in generale i livelli di contaminazione trovati, si osserva che solo in 16 dei 27 campioni con almeno 1 campione di laboratorio non conforme rispetto all'attuale limite di legge di 2 µg/kg sono state trovate concentrazioni superiori a 14,2 µg/kg. Questo valore, tenuto conto dell'incertezza di misura (± 6,2 µg/kg), risulterebbe compatibile con un limite di 8 µg/kg. Attualmente, un comitato scientifico incaricato dalla commissione europea sta valutando i rischi sulla salute umana potenzialmente legati ad un innalzamento a 8 µg/kg per l'Aflatossina B_1 e a 15 µg/kg per le Aflatossine totali dei livelli massimi consentiti in arachidi e pistacchi (10).

Dall'analisi di questi risultati emerge che nella maggior parte dei casi, i due/tre campioni di laboratorio, che formano il campione globale, sono caratterizzati da concentrazioni di Aflatossine molto diverse tra loro. Queste osservazioni sono in accordo con quanto riportato da Spanjer *et al.* (3). Pertanto, nonostante l'applicazione delle procedure di campionamento stabilite dalla normativa comunitaria contribuisca a ridurre la variabilità derivante dal tipo di contaminazione "a macchia di leopardo", tale criticità permane.

Conclusioni

Il controllo di prodotti all'importazione è strettamente legato ad aspetti economici. Nel corso degli anni è stato osservato un calo dei quantitativi di merci alimentari (soprattutto frutta secca e cereali) in ingresso dal porto di Ravenna e conseguentemente del numero di campioni analizzati. In particolare, la recente crisi mondiale ha avuto pesanti ripercussioni su queste attività.

In questo lavoro sono stati presi in esame i risultati ottenuti durante otto anni di attività di controllo delle micotossine in prodotti all'importazione. Sono stati analizzati 1758 campioni per la ricerca di Aflatossine (di cui 1016 arachidi, 141 pistacchi, 221 nocciole e 91 fichi secchi) e 252 per la ricerca di Ocratossina A. La contaminazione da Aflatossine si presenta con una maggiore incidenza (quasi il 10% di campioni non conformi) rispetto a quella da Ocratossina A (meno dell'1%). Tali percentuali sono decisamente superiori rispetto a quelle riscontrate per la ricerca di fitofarmaci in prodotti ortofrutticoli (max 2-3%) (11) ed evidenziano un elevato rischio per la salute umana legato alla contaminazione da Aflatossine in frutta a guscio e frutta secca. A partire dal 2003, con l'applicazione delle procedure di campionamento previste dalla normativa comunitaria, è stato riscontrato un aumento della percentuale di non conformità per Aflatossina B_1 e totali (10-20% negli ultimi cinque anni), le matrici più interessate sono: pistacchi, arachidi, nocciole e fichi secchi. Il 60% dei campioni non conformi presenta concentrazioni di Aflatossina B_1 > di 14 µg/kg in almeno 1 dei 3 campioni di laboratorio. Nonostante l'attuazione delle nuove procedure di campionamento, le criticità legate alla contaminazione eterogenea da micotossine permangono, come indicato dalle diverse concentrazioni di Aflatossina B_1 trovate nei 3 campioni di laboratorio appartenenti allo stesso campione globale.

Bibliografia

1. Unione Europea. Decisione della Commissione n. 2006/504/CE del 12 luglio 2006 che stabilisce condizioni particolari per l'importazione di determinati prodotti alimentari da alcuni paesi terzi a causa del rischio di contaminazione da Aflatossine di tali prodotti. *GUCE* L 199/21, 21 luglio 2006.

2. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *GUCE* L70/12, 9 marzo 2006.
3. Spanjer MC, Scholten JM, Kastrup S, Jorissen U, Schatzki TF, Toyofuku N. Sample comminution for mycotoxin analysis: dry milling or slurry mixing? *Food Additives and Contaminants* 2006;23(1):73-83.
4. Schatzi TF, Toyofuku N. Sample preparation and presampling of pistachios, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;51:6068-72
5. Ozay G, Seyhan F, Yilmaz A, Whitaker TB, Slate AB, Giesbrecht F. Sampling hazelnuts for aflatoxin: uncertainty associated with sampling preparation and analysis, *Journal of AOAC International* 2006;89(4):1004-11.
6. SANCO/1208. Guidance document for competent authorities for the control of compliance with EU legislation on aflatoxin; 2009.
7. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004, relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali. *GUCE* L 165/1, 30 aprile 2004.
8. AOAC Official method 999.07. *Aflatoxin B1 and total Aflatoxins in peanuts butter, pistacchio paste, fig paste, and paprika powder*. AOAC International; 2000.
9. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *GUCE* L364/5, 20 dicembre 2006, aggiornato il 23.07.2008.
10. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. Question N° EFSA-Q-2006-174. *The EFSA Journal* 2007;446:1-127.
11. ARPA Emilia Romagna. *Residui di prodotti fitosanitari su ortofrutticoli freschi ed in altre matrici alimentari, campionati in Emilia Romagna nell'anno 2008*. Ferrara: ARPA Emilia Romagna; 2009. Disponibile all'indirizzo: http://www.arpa.emr.it/cms3/documenti/ferrara/dt/ef/relazione_alimenti_2008.pdf.; ultima consultazione settembre 2009

PROGETTO MICOCER: MONITORAGGIO DEI LIVELLI DI DEOSSINIVALENOLO NELLA GRANELLA DI FRUMENTO DURO (*TRITICUM DURUM* DESF.)

Gabriella Aureli (a), Andreina Belocchi (a), Michelangelo Pascale (b), Tiziana Amoriello (c), Maria Grazia D'Egidio (a), Ersilio Desiderio (a)
(a) Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali, Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Roma
(b) Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari
(c) Direzione Centrale Attività Scientifica Servizio Trasferimento e Innovazione, Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Roma

Introduzione

I cereali costituiscono una fonte privilegiata di nutrienti che sta alla base dell'alimentazione dell'uomo e degli animali soprattutto nelle zone del Mediterraneo, dove sono ampiamente diffusi e coltivati secondo le esigenze climatiche di ciascuna coltura. La gran parte del territorio agricolo italiano è destinato ai cereali e, fra questi, il frumento duro (*Triticum durum* Desf.) costituisce la materia prima di una delle nostre più qualificate filiere del settore agro-alimentare come quella della pasta, per la quale l'Italia è il maggiore produttore nel mondo. Tuttavia, se da un lato il frumento duro rappresenta una componente fondamentale e di largo consumo nell'ambito della dieta mediterranea, dall'altro i prodotti da esso derivati possono rappresentare, per il medesimo motivo, una fonte di esposizione della popolazione verso l'assunzione di sostanze estranee alla materia prima (fitofarmaci, metalli pesanti, micotossine, ecc.). In generale, il rischio relativo alla presenza di tali composti nelle derrate cerealicole, definite dalla normativa europea (1) come "contaminanti" degli alimenti, pone sempre di più l'attenzione dei consumatori sulla sicurezza d'uso e sulle caratteristiche igienico-sanitarie della materia prima.

Fra i vari contaminanti del frumento, le micotossine, prodotti del metabolismo secondario di alcuni funghi del genere *Fusarium* (fusariotossine), rivestono un ruolo molto importante in considerazione sia delle proprietà tossiche verso l'uomo e gli animali, sia della loro diffusione. Il Deossinivalenolo (DON), metabolita appartenente al gruppo dei Tricoteceni, è la micotossina di più frequente riscontro nei cereali, e nel frumento in particolare (2-4), dove viene prodotta e accumulata nella granella a seguito di attacchi di fusariosi della spiga causati soprattutto da *F. graminearum* e *F. culmorum*. Il frumento duro presenta, inoltre, sia una maggiore suscettibilità all'infezione fungina sia livelli più elevati di contaminazione da DON rispetto al frumento tenero (5, 6).

Sulla base della valutazione dell'azione dannosa del DON sulla salute umana e del rischio di esposizione della popolazione attraverso l'assunzione di alimenti contaminati, la normativa europea (7) ha previsto una dose giornaliera tollerabile (*Tolerable Daily Intake*, TDI) pari a 1 µg/kg di peso corporeo e limiti massimi accettabili sul piano tossicologico che, nel caso del frumento duro non trasformato, corrispondono a 1750 µg/kg.

La sostanziale stabilità chimica del Deossinivalenolo, e delle micotossine in generale, ne favorisce, in varia misura, la permanenza lungo tutte le fasi della filiera fino ai prodotti finiti (8, 9). Lo scopo di questo lavoro, svolto nell'ambito del Progetto MICOCER, è stato quello di monitorare i livelli di contaminazione da DON nel frumento duro a livello nazionale nel triennio 2006-2008, al fine di fornire indicazioni a tutti gli operatori del settore non solo sulla presenza

di tale micotossina nelle varie aree di coltivazione ma anche sull'incidenza di alcuni fattori (cultivar, anno, provincia, tipologia di campionamento) e delle loro interazioni sui livelli di contaminazione.

Materiali e metodi

Il monitoraggio per la determinazione del Deossinivalenolo nel frumento duro nazionale si è svolto nell'arco di un triennio (2006-2008) ed ha previsto un programma di campionamento rappresentativo di diversi aspetti della realtà produttiva nazionale quali, aziende agricole e centri di stoccaggio (monitoraggio aziendale) e campi sperimentali (Rete nazionale di confronto varietale frumento duro). I campioni provenienti dal monitoraggio aziendale hanno fornito un quadro aderente alla realtà agricola nazionale, mentre quelli provenienti dai campi sperimentali della Rete di confronto varietale hanno permesso di studiare, a parità di condizioni agronomiche applicate, l'andamento della contaminazione da DON in relazione ai fattori considerati.

Le procedure di campionamento della granella di frumento duro ai fini della determinazione analitica del Deossinivalenolo, sono state eseguite secondo lo schema descritto nel Reg. CE 401/2006 ed hanno interessato, complessivamente, le seguenti regioni: Piemonte, Lombardia, Veneto, Emilia Romagna, Toscana, Umbria, Marche, Lazio, Abruzzo, Molise, Campania, Puglia, Basilicata, Calabria, Sardegna e Sicilia.

Nel complesso, l'insieme dei 2730 campioni di frumento duro, oggetto dell'indagine condotta nelle tre annate agrarie considerate, ha riguardato: 1087 campioni provenienti dal monitoraggio aziendale e prelevati in campo nella fase di post-raccolta (trebbiatura) oppure all'arrivo degli stessi nei centri di stoccaggio; 1643 campioni provenienti dai campi sperimentali della Rete nazionale di confronto varietale frumento duro, coordinata dal CRA-QCE; è stato considerato un gruppo di sei varietà, sempre presenti nel triennio in tutti gli areali della Rete, scelte per la loro diffusione e per la diversa epoca di fioritura: Ciccio, Simeto, Duilio, Iride, Claudio e Creso. Nel biennio 2006-2007, oltre alle sei varietà suddette, nei principali ambienti rappresentativi delle aree della durogranicoltura, sono state analizzate anche tutte le varietà presenti nella Rete (30 in totale) per ciascun anno.

Nella Figura 1 viene riportato, nel dettaglio, il numero totale dei campioni relativo a ciascuna regione. In particolare sono stati presi in esame 285 campioni nelle regioni del Nord (Piemonte, Lombardia, Veneto ed Emilia Romagna), 1063 nel Centro (Toscana, Umbria, Lazio, Marche e Abruzzo) e 1382 nel Sud-Isole (Molise, Campania, Puglia Basilicata, Calabria, Sicilia e Sardegna).

L'analisi di screening del DON è stata eseguita presso il CRA-QCE di Roma utilizzando un test immunoenzimatico-ELISA *(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)* (kit Ridascreen®- DON, R-Biopharm), con un limite di sensibilità di 18,5 µg/kg e un recupero di tossina nei cereali compreso fra l'85 e il 110%. Sul 12% circa dei campioni totali è stata effettuata la determinazione del DON con metodo cromatografico HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (10) a cura dell'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) del Consiglio Nazionale delle Ricerche di Bari.

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando i modelli lineari generalizzati (*Generalized Linear Models*, GLM) basati sulla distribuzione di Poisson della variabile risposta DON e funzione di link data dal logaritmo:

Log (DON) = varietà + anno + provincia + campionamento + varietà x anno
+ varietà x provincia + varietà x campionamento + anno x provincia
+ anno x campionamento + provincia x campionamento
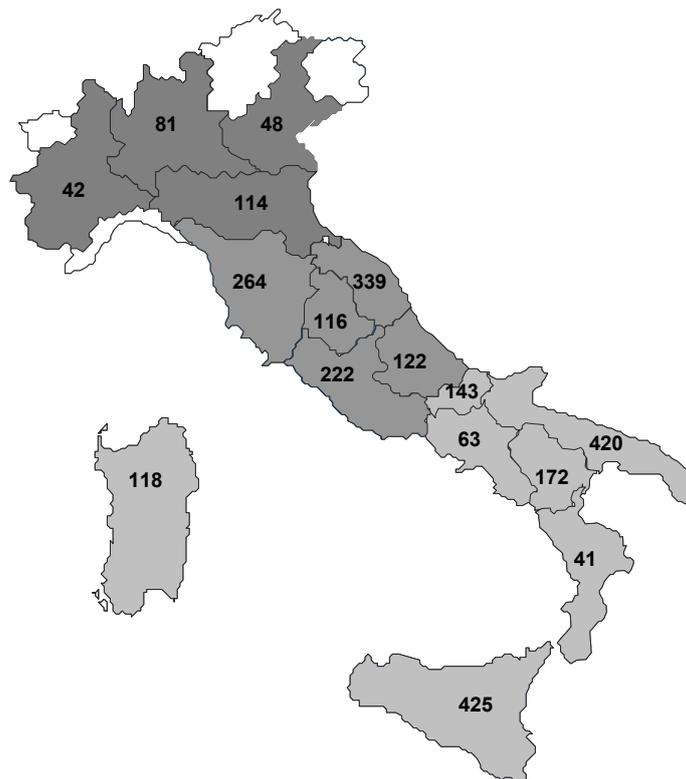
Figura 1. Dislocazione geografica e numerosità per regione dei campioni di frumento duro nel triennio 2006-2008

Il contributo dei fattori considerati e delle loro interazioni alla devianza statistica è stato stimato attraverso il metodo della massima verosimiglianza e la loro significatività attraverso la distribuzione asintotica χ^2.

Il modello considerato è stato applicato sia sulla totalità dei 2730 campioni di frumento duro, sia su un set ridotto di dati comprendenti i campioni relativi alle due diverse provenienze (monitoraggio aziendale e Rete nazionale) delle sei cultivar (Ciccio, Claudio, Creso, Duilio, Iride e Simeto, indicate in seguito come CV).

Risultati e discussione

Nella Tabella 1 sono riportati i dati del triennio 2006-2008 relativi alla concentrazione di DON nei campioni di frumento duro (in totale 1087) provenienti dal monitoraggio aziendale e dai centri di stoccaggio del Centro (436) e del Sud-Isole (651). Risulta evidente il maggiore grado di contaminazione nelle aree del Centro rispetto a quelle del Sud-Isole in relazione soprattutto ai livelli medi più alti (477 µg/kg contro 54 µg/kg) e ai massimi (13561 µg/kg contro 906 µg/kg). Inoltre, la variabilità delle condizioni climatiche nelle diverse annate ha condizionato in modo più marcato il grado di contaminazione da DON nelle aree centrali rispetto a quelle meridionali, dato che per queste ultime i valori medi dei campioni positivi sono risultati pressoché irrilevanti in quanto inferiori a 100 µg/kg.

Tabella 1. Valori di contaminazione da DON in campioni di frumento duro provenienti dal monitoraggio aziendale

Anni	Centro				Sud-Isole			
	n. campioni		DON in positivi (µg/kg)		n. campioni		DON in positivi (µg/kg)	
	totale	*positivi*	*media*	*max*	*totale*	*positivi*	*media*	*max*
2006	150	60	84	449	299	74	54	906
2007	152	86	286	4351	254	89	48	422
2008	134	114	477	13561	98	28	45	329
Totale	436	260	-	-	651	191	-	-

La generale bassa contaminazione delle aree di coltivazione del Meridione è confermata anche dai dati relativi ai campioni dei campi sperimentali della Rete nazionale riportati in Tabella 2. Infatti i valori medi si mantengono sempre su valori inferiori a 100 µg/kg mentre i valori massimi non superano i 500 µg/kg in ciascuno dei tre anni. Nelle zone del Centro, e ancor di più in quelle del Nord, è stata registrata una forte influenza dell'annata con i valori massimi raggiunti nel 2008, l'anno più critico per la diffusione della fusariosi nel frumento. Nel complesso, vi è stata una chiara tendenza alla diminuzione dei livelli di concentrazione procedendo dal Nord verso il Sud.

Tabella 2. Valori di contaminazione da DON dei campioni prelevati presso i campi della Rete nazionale frumento duro

Anni	Nord				Centro				Sud-Isole			
	n. campioni		DON in positivi (µg/kg)		n. campioni		DON in positivi (µg/kg)		n. campioni		DON in positivi (µg/kg)	
	tot.	*pos.*	*media*	*max*	*tot.*	*pos.*	*media*	*max*	*tot.*	*pos.*	*media*	*max*
2006	84	55	291	1280	258	129	225	791	297	46	62	219
2007	135	131	174	502	264	189	155	1285	305	173	88	459
2008	66	66	2211	6764	102	81	480	4613	132	44	57	233
Tot.	285	*252*	-	-	624	399	-	-	734	263	-	-

È opportuno, al riguardo, sottolineare che il riscontro in HPLC dei dati ottenuti con metodo ELISA ha evidenziato un elevato coefficiente di correlazione ($r = 0,9888$) fra i due metodi, relativamente all'intervallo di contaminazione 18,5-13561 µg/kg.

Nella Figura 2, dove sono riportate le percentuali dei campioni positivi sul totale di quelli esaminati (incidenza %), risulta evidente l'influenza delle condizioni climatiche dell'annata nelle aree del Nord e del Centro, con un progressivo aumento di incidenza del DON dal 2006 al 2008. Nelle aree meridionali e insulari la percentuale di campioni positivi non ha mai superato il 35% ad eccezione del dato relativo alla Rete nel 2007 (57%), forse attribuibile alle specifiche condizioni dei campi considerati in quella medesima annata. La percentuale di incidenza più elevata è stata rilevata sempre nell'areale Nord, con un livello massimo del 100% registrato nel 2008.

L'analisi statistica dei dati, relativa al totale dei campioni, ha consentito di valutare l'influenza dei fattori cultivar (CV), tipologia di campionamento (monitoraggio aziendale o Rete), anno e provincia sul livello di contaminazione da Deossinivalenolo. I singoli fattori e le loro interazioni sono risultati tutti altamente significativi ($p<0,0001$).
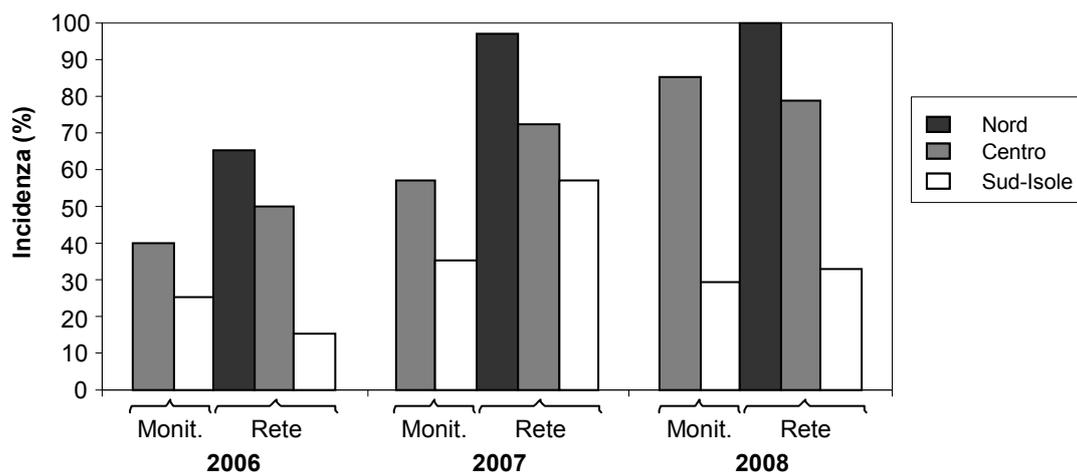
Figura 2. Incidenza percentuale (n. positivi / n. totale x 100) dei campioni di frumento duro positivi al DON nel triennio 2006-2008

Nella Tabella 3 sono riportati i livelli di significatività degli effetti delle variabili considerate in relazione al grado di contaminazione da DON nelle singole regioni. Sono stati evidenziati in grigio i fattori che hanno avuto un peso maggiore nel determinare il contenuto in micotossina. L'anno è senza dubbio il fattore più rilevante per tutto il territorio nazionale, mentre la varietà (CV) sembra avere un ruolo incisivo soprattutto nel Centro-Sud. È interessante osservare, fra l'altro, che in Sicilia, per le caratteristiche climatiche proprie di tale ambiente, la scelta varietale ha un ruolo primario sia come fattore singolo che come interazione con l'anno e la provincia. Le interazioni hanno un peso più marcato nel Centro-Sud e nelle isole rispetto al Nord.

Tabella 3. Campioni del monitoraggio aziendale e della Rete nazionale: livelli di significatività degli effetti dei fattori (singoli e interazioni) sulla contaminazione da DON sull'insieme dei campioni

Regioni	CV	C	A	P	CV xC	CVxA	CV xP	CxA	CxP	AxP
Piemonte	***	***	***	***	***	ns	***	ns	***	ns
Lombardia	***	***	***	***	ns	***	***	ns	ns	***
Veneto	***	***	***	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns
E. Romagna	***	***	***	***	ns	***	***	ns	ns	***
Marche	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Abruzzo	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Toscana	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Umbria	***	***	***	***	ns	***	ns	ns	ns	ns
Lazio	***	***	***	***	***	***	***	***	***	*
Molise	***	***	***	-	***	***	-	***	-	-
Basilicata	***	***	***	***	ns	***	***	***	ns	***
Calabria	***	***	ns	-	***	ns	-	ns	-	-
Campania	***	***	***	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Puglia	*	***	**	***	***	***	***	***	***	***
Sardegna	***	***	***	***	***	***	***	***	ns	***
Sicilia	***	***	***	*	***	***	***	***	***	*

CV: varietà; **C**: campione; **A**: anno; **P**: province
***significativo (p< 0,0001), ** significativo (p< 0,001); *significativo (p< 0,05); ns = non significativo.

Al fine di avere un riscontro dei risultati ottenuti dall'elaborazione dei dati complessivi di tutto il triennio, indipendentemente dal tipo di campionamento, e relativo a tutte le varietà considerate, è stato effettuato uno studio statistico circoscritto alle sei varietà scelte (Ciccio, Simeto, Duilio, Iride, Claudio e Creso) le quali, fra l'altro, rappresentano un gruppo omogeneo in merito alla numerosità dei campioni esaminati sia nel monitoraggio aziendale che nella Rete nazionale. Anche in questo caso i fattori (cultivar, anno, regione e provincia), considerati sia singolarmente che nelle loro interazioni, sono risultati tutti altamente significativi (p< 0,0001).

Nella Tabella 4 sono riportati i livelli di significatività degli effetti delle variabili considerate nelle singole regioni, evidenziando in grigio i fattori maggiormente significativi nel determinare il contenuto in micotossina. Tutti e tre i fattori semplici (cultivar, anno, provincia) sono risultati significativi, mentre le interazioni sono risultate significative soprattutto per il Nord e per il Centro. Il fattore che maggiormente influisce sul livello di DON è l'anno per il Centro-Nord, la provincia per il Centro e la varietà per il Sud.

Tabella 4. Monitoraggio aziendale e Rete nazionale: livelli di significatività degli effetti dei fattori (singoli e interazioni) sulla contaminazione da DON nelle sei varietà (Ciccio, Simeto, Duilio, Iride, Claudio e Creso); in grigio i fattori maggiormente significativi nel determinare il contenuto in micotossina

Regione	CV	P	A	CVxP	CVxA	PxA
Piemonte	ns	***	***	ns	ns	ns
Lombardia	***	***	***	***	***	***
Veneto	***	**	***	***	***	***
Emilia Romagna	***	***	***	***	***	**
Marche	***	***	***	***	***	***
Abruzzo	ns	***	ns	ns	ns	ns
Toscana	***	***	***	***	***	***
Umbria	***	***	***	ns	***	ns
Lazio	**	***	***	***	**	***
Molise	**	-	*	-	**	-
Basilicata	***	***	*	***	***	***
Calabria	***	-	ns	-	ns	-
Campania	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Puglia	ns	***	***	ns	ns	***
Sardegna	ns	***	***	ns	ns	ns
Sicilia	***	ns	ns	ns	ns	ns

CV: varietà; **C**: campione; **A**: anno; **P**: province
***significativo (p< 0,0001), ** significativo (p< 0,001); *significativo (p< 0.05); ns = non significativo.

L'uso dei GLM nell'elaborazione statistica ha permesso anche di analizzare il grado di suscettibilità al DON per le sei varietà in esame.

Nella Tabella 5 le singole cultivar sono state classificate in scala crescente, in base alla sensibilità al DON, per ogni Regione e per macro-area. Le sei varietà indicate con il carattere in grassetto, relativamente ad una stessa regione, risultano al loro interno non significativamente differenti, pertanto l'ordine di suscettibilità al DON non è rilevante. Ciò vale anche per le varietà in corsivo. I due gruppi, contraddistinti in grassetto e/o corsivo, sono comunque statisticamente diversi dalle varietà indicate con il carattere normale.

Tabella 5. Monitoraggio aziendale e Rete nazionale: sensibilità alla contaminazione da DON per le sei varietà (Ciccio, Simeto, Duilio, Iride, Claudio e Creso).

Macro-area	Regione	– Sensibilità al DON					+
Nord	Piemonte	Iride	Claudio	Duilio	**Simeto**	**Ciccio**	Creso
	Lombardia	Claudio	Duilio	Iride	Creso	Simeto	Ciccio
	Veneto	Claudio	**Creso**	**Ciccio**	Iride	Duilio	Simeto
	Emilia Romagna	Claudio	**Ciccio**	**Iride**	Creso	Duilio	Simeto
Centro-Adriatico	Marche	Creso	**Iride**	**Duilio**	**Ciccio**	Simeto	Claudio
	Abruzzo	Ciccio	Claudio	Duilio	**Iride**	**Simeto**	Creso
Centro-Tirrenico	Toscana	Creso	Ciccio	Duilio	**Iride**	**Simeto**	Claudio
	Umbria	Creso	Claudio	Iride	Simeto	Ciccio	Duilio
	Lazio	Creso	**Claudio**	**Duilio**	**Iride**	*Simeto*	*Ciccio*
Sud	Molise	Ciccio	Iride	Creso	Duilio	Simeto	Claudio
	Basilicata	**Duilio**	**Ciccio**	**Creso**	*Claudio*	*Simeto*	Iride
	Calabria	Creso	Claudio	**Duilio**	**Iride**	*Ciccio*	*Simeto*
	Campania	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Puglia	**Ciccio**	**Claudio**	Iride	**Simeto**	**Creso**	Duilio
Isole	Sardegna	**Creso**	**Claudio**	**Iride**	Ciccio	Duilio	Simeto
	Sicilia	**Duilio**	**Iride**	**Creso**	*Ciccio*	*Claudio*	Simeto

Il comportamento delle singole cultivar appare ben differenziato nelle diverse zone geografiche del territorio italiano. In particolare:

- la varietà Claudio risulta essere la meno sensibile nel Nord e una delle meno sensibili nel Centro-Sud, con l'eccezione di Marche, Toscana e Molise;
- al Centro la varietà Creso è la meno suscettibile;
- le varietà Iride, Duilio e Ciccio mostrano, con alcune eccezioni, un grado moderato di sensibilità;
- Simeto è la varietà che mostra la maggiore sensibilità alla contaminazione sostanzialmente in tutto il territorio nazionale.

Se si considera solo il set di dati relativi alle sei varietà suddette ma limitatamente alla sperimentazione della Rete nazionale, si conferma quanto detto (Tabella 5) sia in merito alla significatività degli effetti dei fattori considerati, sia alla suscettibilità alla contaminazione con piccoli scostamenti come, ad esempio, la minore sensibilità della varietà Ciccio in tutte le regioni meridionali ad eccezione della Calabria.

Conclusioni

Il monitoraggio della contaminazione da DON, svolto nell'ambito progetto "MICOCER" nel triennio 2006-2008, ha fornito un quadro d'insieme sul grado di diffusione e sull'entità dei livelli di contaminazione da Deossinivalenolo dei campioni provenienti sia da zone tipicamente interessate dalla coltura del frumento duro sia da alcune aree del Nord dove tale coltura è meno diffusa. In particolare, il campionamento effettuato presso le aziende agricole e i centri di stoccaggio (monitoraggio aziendale) ha fornito un quadro aderente alla realtà agricola nazionale, mentre quello relativo ai campi sperimentali appartenenti alla Rete di confronto varietale ha permesso di effettuare un confronto dei dati, a parità di condizioni agronomiche applicate.

I risultati ottenuti hanno evidenziato il diverso grado di accumulo e di incidenza di DON procedendo dalle zone del Nord verso quelle del Sud, dove i valori di DON sono risultati pressoché trascurabili. Tali risultati possono contribuire, fra l'altro, ad una più mirata valutazione del rischio di contaminazione che tenga conto dell'ambiente inteso come micro-areale e cioè delle caratteristiche pedo-climatiche proprie delle singole zone di coltivazione.

L'elaborazione statistica dei dati relativi al totale dei campioni ha messo in evidenza il ruolo fondamentale svolto dall'annata, sia come fattore singolo che nella sua interazione con le altre variabili, soprattutto nelle province del Nord e del Centro. Il fattore geografico (localizzazione sul territorio) riveste un ruolo primario soprattutto nel Centro; per quanto riguarda le zone del Sud il fattore di gran lunga più significativo è la varietà, in quanto non risultano significativamente influenti né il fattore anno né quello geografico, confermando così la vocazionalità del territorio per la coltura del frumento duro.

Il confronto dei dati di contaminazione relativi alle sei cultivar fra le più diffuse sul territorio nazionale ha permesso di rilevare significative differenze fra le varietà in merito alla suscettibilità al DON anche in relazione alle diverse zone di coltivazione. In particolare, la varietà Simeto è risultata la più sensibile sostanzialmente in tutto il territorio nazionale; la varietà Claudio risulta essere la meno suscettibile nel Nord e una delle meno sensibili nel Centro-Sud, con l'eccezione di Marche, Toscana e Molise, mentre al Centro è la varietà Creso e al Sud e la varietà Ciccio.

Nell'insieme, i dati relativi al comportamento varietale indicano che la suscettibilità all'accumulo del DON può essere legata, oltre che alle caratteristiche proprie della cultivar, anche all'ambiente nel quale la stessa viene coltivata (es.: minore suscettibilità di Creso nell'Italia centrale), oppure può risentire meno della localizzazione geografica e manifestare in modo tendenzialmente costante le caratteristiche di maggiore o minore resistenza alla contaminazione, come ad esempio le varietà Claudio e Simeto rispettivamente. Quest'ultima cultivar, in particolare, probabilmente non ha avuto modo di sviluppare forme di resistenza alla fusariosi essendo stata selezionata in Sicilia dove la diffusione di tale fitopatia, e quindi la contaminazione da DON, sono pressoché irrilevanti. I risultati ottenuti nel presente lavoro evidenziano, in linea generale, una relazione fra il grado di resistenza varietale all'accumulo di micotossina e le caratteristiche genetiche delle cultivar le quali, evidentemente, hanno un ruolo importante nel determinare il tipo di risposta della cultivar stessa alle condizioni dei diversi ambienti di coltivazione. Tale risposta non sembra essere condizionata in modo preponderante dall'epoca di fioritura delle singole cultivar.

Considerata l'imprevedibilità delle variabili climatiche nelle annate agrarie, la scelta varietale, in funzione non solo delle caratteristiche agronomiche ma anche dell'adattabilità all'ambiente di coltivazione, rimane uno degli aspetti più importanti nella gestione del rischio di contaminazione da DON.

Bibliografia

1. Unione Europea. Regolamento (CEE) dell'8 febbraio 1993, n. 315 che stabilisce le procedure comunitarie relative ai contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L. 37, 13 febbraio 1993.
2. Edwards SG, Barrier-Guilliot B, Clasen P-E, Hietaniemi V, Pettersson H. Emerging issues of HT-2 and T-2 toxins in European cereal production. *World Mycotoxin Journal* 2009;2(2):173-9.
3. Rossi V. Fusariosi della spiga, malattia a molte facce. *L'Informatore Agrario* 2006;12(Suppl.):19-23.
4. Pestka JJ, Smolinski AT. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B* 2005;8:39-69.

5. Romani S, Pinnavaia G, Dalla Rosa M. Caratteristiche qualitative e presenza di micotossine in grano duro infetto da *Fusarium* spp. *Tecnica Molitoria* 2005;6:617-24.
6. Campagna C, Haidukowski M, Pancaldi D, Pascale M, Ravaglia S, Silvestri M, Visconti A. Fonti di rischio e gestione delle micotossine nel frumento*. L'Informatore Agrario* 2005;1:39-47.
7. Unione Europea. Regolamento (EC) n. 1881 del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea Serie* L. 364/5, 20 dicembre 2006.
8. Lancova K, Hajslova J, Kostelanska M, Kohoutkova J, Nedelnik J, Moravcova H, Vaniva M. Fate of trichothecene mycotoxins during the processing: Milling and baking*. Food Additives and Contaminants* 2008;25(5):650-9.
9. Bullerman LB, Bianchini A. Stability of mycotoxins durino food processing. *International Journal of Food microbiology* 2007;119:140-6.
10. Pascale M, Bottalico A, Pancaldi D, Perrone G, Visconti A. Occurrence of deoxynivalenol in cereals from esperimental fields in various Italian regions. *Petria* 2002;12:123-9.

EFFETTI DELLE AFLATOSSINE SUGLI ASPETTI PRODUTTIVI NELLA BUFALA MEDITERRANEA ITALIANA

Giuseppe Auriemma, Giuseppe Grazioli, Rodolfo Baculo, Fiorella Sarubbi
Istituto per il Sistema Produzione Animale in Ambiente Mediterraneo, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Napoli

Introduzione

Il mais *(Zea mays)* è un cereale che ha assunto, a livello mondiale, una diffusione e un'importanza crescenti. Gran parte del mais coltivato in Italia (82%) è destinato all'alimentazione degli animali ad interesse zootecnico; se a questa percentuale si aggiunge la quota del 3,7% di mais utilizzato come sottoprodotto dell'industria dell'amido, si raggiunge un valore dell'86%. La granella e l'insilato di mais sono la fonte energetica per eccellenza nell'alimentazione dei ruminanti per cui la presenza di Aflatossine (AF) rappresenta un serio problema.

L'impiego del mais come pianta intera, trinciato e insilato, e delle diverse parti botaniche (pastone di pannocchia) è largamente diffuso in quanto costituisce un alimento di grande interesse nutrizionale per le sue caratteristiche di elevata appetibilità, versatilità e buona digeribilità dei principi nutritivi, oltre ad essere caratterizzato da un basso costo di acquisto e produzione.

La granella di mais, in diverse forme fisiche (intera, sfarinata, fioccata, estrusa, ecc.) rappresenta invece la fonte energetica per eccellenza nell'alimentazione sia dei monogastrici (suini, avicoli, ecc.) che dei grandi e piccoli ruminanti.

Le problematiche relative alla presenza delle micotossine nel mais destinato all'alimentazione degli animali ad interesse zootecnico rappresentano un serio problema e possono essere riassunte in due grossi capitoli:

- salute e benessere degli animali, in quanto possono influire sulle attività metaboliche e quindi sulle funzioni fisiologiche che garantiscono lo stato di salute dell'animale stesso;
- tutela del consumatore in quanto ingerisce alimenti di origine animale che potrebbero essere contaminati in seguito ad ingestione da parte dell'animale stesso delle micotossine (es. insilato contaminato da Aflatossina B_1 → latte con Aflatossina M_1).

L'Aflatossina B_1 (AFB_1) è quella presente in maggior quantità e sulla quale è stato focalizzato l'interesse dei ricercatori per via della sua elevata tossicità acuta e cronica.

Gli alimenti che contengono AF con maggior frequenza sono i cereali e suoi derivati; ma va ricordato che una cattiva conservazione può far comparire le AF anche in prodotti non considerati a rischio.

I livelli di AF comprese tra 0,3-0,7 mg/kg vengono considerati tossici per le vacche da latte (1), mentre i vitelli sono già sensibili alla presenza 0,02 mg/kg (2).

Bovini, suini e volatili sono gli animali maggiormente sensibili alla AFB_1 e i sintomi vengono osservati già ad 1 o 2 giorni dall'esposizione (3). Contaminazioni di 0,2 mg/kg sono già in grado di diminuire la crescita giornaliera, di ridurre l'attività ruminale, l'efficienza alimentare e riproduttiva causando una minore produzione di latte (4, 5). L'effetto sulla riproduzione non sembra essere diretto ed è piuttosto dovuto a un'azione indiretta attraverso altri sistemi fisiologici.

L'AFM_1 (*milk toxin*) è stato il primo metabolita della AFB_1 ad essere identificato. Tutti i poligastrici che ingeriscono AFB_1 ne eliminano una quota come AFM_1 nel latte; nel caso dei grossi ruminanti, la quota eliminata è generalmente l'1-3% di quella ingerita. Vi è tuttavia un'elevata variabilità di escrezione, dovuta sia a fattori individuali che allo stadio di lattazione. Il *carry-over* di un singolo animale è 3,3-3,5 volte maggiore a inizio lattazione che a lattazione avanzata ed è linearmente correlato con il livello produttivo. Nel caso delle bufale, nel latte, accanto ad AFM_1 viene eliminata anche AFB_1.

In considerazione del fatto che la principale influenza negativa sulla fertilità, e quindi sulla produttività, deriva non tanto dalle infezioni specifiche o non della sfera genitale, quanto dagli effetti di una serie di fattori che esercitano la loro azione interagendo fra loro, rendendo difficile una diagnosi causale dell'infertilità in un dato allevamento, e che tra questi fattori le micotossine giocano un ruolo fondamentale, si è concentrata l'attenzione degli autori sulla presenza di AFB_1 nell'insilato di mais; sulla presenza di AFM_1 nel latte e l'influenza che questi hanno mostrato sugli aspetti produttivi e metabolici nella bufala mediterranea italiana.

Si preferito concentrare l'attenzione sulla bufala mediterranea italiana in considerazione dell'importanza economico-ambientale sul sistema agro-zootecnico del Mezzogiorno d'Italia.

Materiale e metodi

Analisi qualitativa degli insilati

La determinazione della composizione chimica rappresenta il primo fondamentale passo nella valutazione qualitativa dell'insilato. Infatti non bisogna dimenticare che lo scopo dell'alimentazione e nutrizione animale è quello di massimizzare l'efficienza di trasformazione dell'alimento nelle diverse produzioni dell'animale e, se possibile, anche quello di influenzare positivamente le caratteristiche qualitative delle produzioni stesse.

Nella Figura 1 si riporta lo schema base seguito per le determinazioni chimiche nutrizionali effettuati secondo le indicazioni AOAC (6) e di Bhandari *et al.* (7).
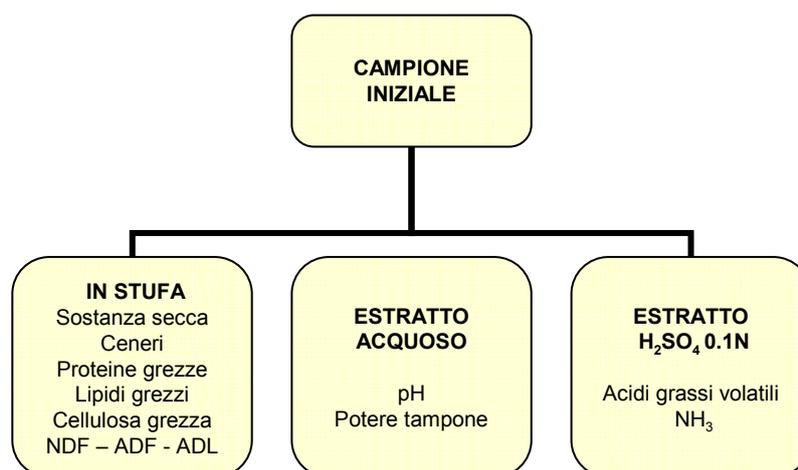
Figura 1. Schema base seguito per le determinazioni chimiche nutrizionali

Determinazione delle AF

Per la determinazione delle AFB_1 50 g circa di campione sono stati disposti in frullatore con 10 g di NaCl.

Sono stati aggiunti circa 200 mL di metanolo:acqua (80:20, v:v) e frullati ad alta velocità per circa 1 minuto. L'estratto così ottenuto è stato filtrato su carta Whatmann 541 e raccolto in beuta. Sono stati miscelati 10 mL dell'estratto filtrato con 40 mL di acqua ultrapura in *vortex*. La soluzione così ottenuta e diluita è stata filtrata ulteriormente con filtro in microfibra di vetro e aspirato in siringa di vetro fino ad ottenere circa 4 mL (corrispondente a circa 0,2 g di campione iniziale). Alla base della siringa è stata posizionata una colonna cromatografica ad immunoaffinità monoclonali (Aflatest), al di sotto della quale era posizionato un beacker di raccolta. Il passaggio nella colonna è stato impostato a una velocità di circa 1-2 gocce al secondo fino a quando nella colonna è iniziata a entrare aria. A questo punto la colonna è stata lavata con 5 mL di acqua bidistillata, alla stessa velocità del campione. La colonna è stata successivamente lavata con 1 mL di metanolo per HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) sempre alla stessa velocità e l'eluato (circa 1 mL) è stato raccolto in cuvetta di vetro. È stato poi aggiunto 1 mL di Aflatest Developer e agitato il tutto su *vortex*. Circa 30 µL del campione così ottenuto sono stati iniettati in HPLC.

L'analisi in HPLC (LC-10AC Shimatzu) è stata effettuata in isocratica con le seguenti condizioni:

- colonna Supelcosil C18 termostata a 35°C;
- fase mobile: acetonitrile:acqua (15:85, v:v);
- flusso di 1 mL/min;
- volume di iniezione 10 µL;
- detector fluorimetro ($\lambda_{eccitazione}$ a 365 nm ed $\lambda_{emissione}$ a 440 nm).

La soluzione standard di taratura è stata ottenuta diluendo la soluzione stock nella stessa miscela di acetonitrile:acqua con concentrazioni crescenti da 0,5 a 25 mg/kg.

Analisi campioni di latte

I campioni di latte sono stati prelevati individualmente su un campione rappresentativo della mandria in ogni azienda a entrambe le mungiture giornaliere (5 am e 5 pm). Il campione finale è stato ottenuto miscelando il campione raccolto a ogni mungitura tenendo conto della quantità di latte prodotto.

Su ogni campione, dopo aver registrato la quantità di latte prodotto, sono state effettuate le seguenti determinazioni:

- grasso (Metodo Gerber);
- proteine grezze (Metodo Kjeldhal);
- AFM_1.

Determinazione delle AFM_1

Il campione di latte è stato sgrassato per centrifugazione a 3000 g per 15 minuti. Sono stati prelevati circa 30 mL di latte. Attraverso una colonna di immunoaffinità (Easy-extract) si è fatto passare il latte a una velocità di circa 2-3 mL al minuto, e la colonna è stata poi lavata con 10 mL di acqua. Circa 2 mL di eluato sono stati trasferiti in fiala e portati a secco sotto flusso di azoto e poi ricostituiti con acqua-acetonitrile (80:20; v:v) fino a un volume di circa 300 µL. La soluzione è stata filtrata con filtro per siringa con porosità pari a 0,2 µm.

L'analisi in HPLC è stata effettuata in isocratica con le seguenti condizioni:

- colonna Supelcosil C18 column termostata a 35°C;
- fase mobile: acqua:acetonitrile:metanolo (68:24:8, v:v:v);
- flusso: 1 mL/min;
- volume di iniezione: 10 μL;
- detector fluorimetro ($\lambda_{eccitazione}$ a 363 nm ed $\lambda_{emissione}$ a 433 nm).

Analisi campioni di sangue per la determinazione del profilo metabolico

Urea, glucosio, creatinina, ALT e AST sono stati determinati sui campioni del siero, raccolti una volta alla settimana da ogni bufalo dalla vena giugulare, con il metodo Vacutainer. I parametri sono stati determinati sul siero usando il Reflotron (Boehringer, Ingelheim, Germania).

Risultati e discussione

Determinazione della composizione chimico-nutrizionale degli insilati

L'analisi chimico-nutrizionale (Tabella 1) degli insilati raccolti nelle aziende considerate è risultata essere nella media del buon insilato a dimostrazione della seria pratica agronomica effettuata dagli allevatori. Le determinazioni del pH e del potere tampone sono state effettuate su estratti acquosi degli insilati appena campionati. I risultati ottenuti (Tabella 1) sono risultati essere nella media dei valori riportati in bibliografia.

Tabella1. Valori medi, con le rispettive deviazioni standard, della composizione chimica, del pH e del potere tampone degli insilati campionati

Parametri degli insilati	Valore
Sostanza secca	28,36±3,54
Ceneri	6,24±1,14
Proteine grezze	7,68±1,87
Lipidi grezzi	2,26±0,74
NDF	45,36±4,86
ADF	27,89±3,67
ADL	3,75±0,97
pH	4,24±0,65
Potere tampone	67,72±28,46

Determinazione degli acidi grassi volatili

La determinazione degli acidi grassi volatili è stata effettuata su estratti solforici ottenuti su campioni freschi nello stesso giorno del campionamento. Gran parte degli insilati ha mostrato una composizione in acidi grassi volatili nella norma dei buoni insilati. In qualche caso, dove anche a livello macroscopico, vi era la presenza di muffe e/o di un cappello visibile sulla superfice superiore del silos, sono stati riscontrati livelli elevati di acido valerianico.

Di seguito si riportano i valori medi degli acidi grassi volatili (g/kg t.q.) riscontrati negli insilati dove l'acido valerianico era assente:

Ac. lattico 19,75 ± 7,07
Ac. acetico 10,91 ± 1,76
Ac propionico 2,46 ± 0,56

Ac. isobutirrico 4,44 ± 1,19
Ac butirrico 2,75 ± 0,80
Ac. isovaleranico 0,00 ± 0,00
Ac. valerianico 0,00 ± 0,00

I valori medi degli acidi grassi volatili (g/kg t.q.) negli insilati che presentavano contaminazioni macroscopiche è stata la seguente:

Ac. lattico 12,04 ± 2,14
Ac. acetico 3,81 ± 0,75
Ac propionico 3,57 ± 0,42
Ac. isobutirrico 1,68 ± 0,87
Ac butirrico 2,25 ± 0,36
Ac. isovaleranico 0,73 ± 0,05
Ac. valerianico 16,64 ± 7,85

Determinazione del contenuto in Aflatossina negli insilati di mais

Dall'esame dei dati ottenuti degli insilati raccolti è emerso che nel 73,3% delle aziende è stata registrata una presenza significativa di muffe e lieviti. La colonizzazione da parte di questi microrganismi si è verificata per il 63,16% delle volte nel periodo estivo. Le elevate temperature e l'umidità che caratterizzano questo periodo, unitamente all'utilizzazione della parte finale del silomais, componente principale di gran parte delle diete somministrate, probabilmente rappresentano la causa dei valori elevati riscontrati.

I valori di AF dosate nei singoli alimenti e calcolati sul totale delle razioni somministrate rientrano in gran parte del periodo nei limiti stabiliti per la B_1 dal Reg. CE 1525/1998.

Nella seguente Tabella riportiamo i valori di AFB_1 nelle aziende considerate.

Tabella 1. Contenuti in AFB_1 nelle aziende considerate

Azienda	AFB_1 (µg/kg) media	AFB_1 (µg/kg) deviazione standard
A	3,78	0,12
B	2,89	0,08
C	3,14	0,10
D	3,72	0,12
E	3,84	0,14
F	3,57	0,10
G	2,81	0,09
H	4,72	0,20

Dall'esame della Tabella appare evidente che i livelli di AFB_1 risultano non particolarmente elevati.

Analisi campioni di latte

Si riporta di seguito i dati relativi alla quantità di latte prodotto e le corrispettive percentuali di grasso e proteine nelle aziende selezionate sul territorio regionale (Tabella 2).

Sono state prese in considerazione 30 bufale pluripare per ogni azienda considerata nella prova sperimentale.

Tabella 2. Caratteristiche medie del latte nelle diverse aziende considerate

Azienda	kg latte prodotto		% di grasso		% proteine	
	media	**DS**	**media**	**DS**	**media**	**DS**
A	10,21	3,07	9,04	1,24	4,69	0,46
B	9,20	2,92	8,56	1,63	5,06	0,48
C	8,29	2,85	8,31	1,48	5,03	0,43
D	9,70	2,36	8,75	1,93	4,85	0,41
E	9,59	2,34	8,73	1,92	4,75	0,39
F	9,84	3,01	8,70	1,62	4,56	0,29
G	12,29	2,74	8,58	2,02	4,65	0,37
H	11,51	2,30	8,13	1,85	4,66	0,41

DS: Deviazione Standard

Sono state prese in considerazione bufale tra la seconda e la quarta lattazione, anche in vista del confronto statistico finale sull'influenza dell'inquinamento da micotossine sugli aspetti produttivi.

Le differenze riscontrabili tra le aziende sono risultate essere legate più alla diversa fase di lattazione in cui si trovavano le bufale al momento del prelievo che ad inquinamento da Aflatossine.

Determinazione del contenuto in AFM_1

In considerazione del fatto che la variabilità del passaggio di AFB_1 nel latte (sottoforma di M_1) è legata ai seguenti fattori:

- stadio di lattazione (passaggio superiore a inizio lattazione);
- produzione di latte/lattazione;
- stato clinico della mammella (presenza di mastiti);
- variabilità individuale ed età dei soggetti.

Sono stati scelti animali quanto più omogenei tra di loro in modo da ridurre al minimo la possibilità che differenti quantità di M_1 fossero legata alle variabili indicate.

Nelle aziende esaminate i valori riscontrati sono stati i seguenti (Tabella 3).

Tabella 3. Percentuale di positività all'AFM_1

Azienda	% campioni positivi all'AFM_1
A	2
B	3
C	5
D	4
E	2
F	5
G	4
H	3

Tenendo conto del fatto che l'AFM_1 è una molecola semipolare che nel latte si lega principalmente alla caseina, possiamo dedurre che nella produzione del formaggio circa il 50% della tossina iniziale si ritroverà nella cagliata e pertanto le concentrazioni nel formaggio potranno essere sensibilmente più alte di quelle del latte con cui è stato prodotto.

Considerando che la lavorazione del formaggio avviene su latte di massa e non su latte individuale, appare chiaro che tali valori percentuali possono essere considerati non significativi. Infatti indagini effettuate su latte di massa per azienda non hanno mostrato alcuna positività.

Per completezza dei risultati si riportano che il 48% dei campioni hanno mostrato valori di AFM_1 inferiori a 0,02 mg/kg, il 20% valori tra 0,02 e 0,03 mg/kg, e il 4% tra 0,03 e 0,05 mg/kg.

Analisi campioni di sangue per la determinazione del profilo metabolico

Si riporta di seguito la Tabella relativa ai dosaggi dei principali parametri ematochimici rappresentativi dei diversi metabolismi (Tabella 4):

Tabella 4. Alcuni parametri del profilo metabolico di campioni di sangue (media e DS)

Azienda	Urea mg/dL		Glucosio mmol/L		Creatinine µmol/L		AST UI/L		ALT UI/L	
A	54,62	8,12	3,34	0,26	137,43	16,79	157,01	25,87	66,49	8,58
B	56,40	9,41	3,36	0,95	136,27	18,36	158,08	26,13	65,85	9,24
C	50,90	7,67	3,41	0,64	127,55	16,57	165,77	27,67	66,15	10,7
D	50,62	8,25	3,34	0,71	129,78	15,32	161,87	29,92	67,53	9,15
E	51,25	8,16	3,43	0,68	130,54	16,24	160,39	26,15	66,58	8,57
F	54,12	7,59	3,39	0,59	131,01	14,39	159,87	24,31	65,97	7,89
G	52,36	8,23	3,25	0,71	129,69	14,27	161,05	20,98	65,47	9,02
H	53,16	6,98	3,15	0,70	130,03	15,63	160,34	21,39	63,21	7,96

Dall'esame della tabella appare evidente che non sono risultate differenze significative tra le aziende anche se le aziende A e B hanno mostrato valori significativamente più alti rispetto alle altre aziende. È da sottolineare che i valori riscontrati sono stati, in tutti i casi analizzati, superiori a quelli considerati fisiologici, anche se in linea con altri dati riportati in letteratura (8).

Questi parametri non ritrovano riscontro con i valori di AF rilevati precedentemente.

Conclusioni

La pericolosità e gli effetti tossici delle micotossine a carico di uomini e degli animali hanno addirittura preceduto l'individuazione delle micotossine stesse come colpevoli. L'interesse della ricerca scientifica è costantemente in via di evoluzione ed è finalizzato alla comprensione degli effetti negativi a carico delle produzioni zootecniche, alla comprensione dei meccanismi patogenetici a carico dell'uomo e alla prevenzione della contaminazione.

Nelle prove sperimentali oggetto del presente lavoro scarsi sono stati i livelli di micotossine nelle diete somministrate ai bufali sottoposti ad indagine sperimentale, e la dove presenti, anche se all'interno del limite di legge non hanno causato cambiamenti nei parametri zootecnici considerati.

Le differenze significative riscontrate tra le aziende sono risultate essere imputabili più a condizioni manageriali diverse che ad inquinamento da micotossine.

Per ciò che concerne le Aflatossine possiamo considerare che le modalità e le variabili che condizionano il *carry-over*, cioè la percentuale di passaggio dell'AFB_1 nel latte sotto forma di M_1, possono essere le seguenti:

- elevata variabilità individuale tra gli animali;
- *carry-over* maggiore a inizio lattazione rispetto alla fase di lattazione avanzata (aumenta in modo più che proporzionale rispetto alla produzione di latte);
- infezioni della mammella.

La quantità di AFM_1 (µg/kg latte) nel latte può essere prevista utilizzando la seguente formula: AFB_1 ingerita/capo/giorno (µg) × 1,19 + 1,9. Per produrre latte con $AFM_1 \leq 50$ ng/kg (o meglio 0,05 µg/kg latte) gli animali devono ingerire una quantità di AFB_1 <40 µg/capo/giorno. Va tenuto presente che la comparsa di AF nel latte in seguito ad ingestione è molto rapide: se si somministrano alimenti contaminati, l'AFM_1 comparirà nel latte già nella mungitura successiva, anche se ci vogliono 2-3 giorni perché il livello si stabilizzi; quando poi si riprende a fornire una razione esente da AF, i livelli di AFM_1 nel latte diminuiscono dalla mungitura successiva, azzerandosi in 2-3 giorni.

Esistono degli interventi pratici finalizzati a ridurre la possibilità di inquinamento da micotossine che ci è sembrato interessante riportare e che possono essere così riassunti:

- *monitorare il latte*
  ogni 15 giorni (e a ogni modifica della razione) è necessario verificare il livello di AFM_1 nel latte presso un laboratorio di fiducia, va tenuto presente che l'AFM_1 nel latte è la valutazione più attendibile del livello di AFB_1 nella razione.

- *monitorare le componenti della razione*
  le operazioni di monitoraggio della razione vanno indirizzate soprattutto e almeno inizialmente verso il trinciato integrale di mais e il pastone, e verso la granella di mais e i suoi derivati integrali.

Per quanto riguarda il monitoraggio va innanzitutto tenuto presente che:

- i risultati delle analisi sono validi solo se si effettua un campionamento corretto e rappresentativo dell'alimento; inoltre, se durante il periodo di tempo che intercorre tra il prelievo e l'analisi, l'umidità del prodotto non è stabilizzata, i campioni vanno tenuti surgelati;
- i risultati di una sola analisi devono essere confrontati con quelli ottenuti in condizioni simili nella zona, al fine di ridurre gli errori di interpretazione o le conseguenze di un prelievo errato o, sebbene siano rari, gli errori in fase di analisi (falsi positivi o negativi);
- nell'insilato a maturazione cerosa le alterazioni dovute alla presenza di muffe tossigene produttrici di Aflatossine non si vedono, pertanto non bisogna fidarsi delle apparenze.

Nel caso sia stata accertata la presenza di Aflatossine negli alimenti aziendali o sia stato riscontrato un elevato numero di casi positivi nei trinciati o nei pastoni della zona di monitoraggio è necessario:

a) eliminare tutte le parti dell'alimento che presentano deterioramento aerobico perché proprio lì è più probabile la presenza di elevate concentrazioni di Aflatossine;
b) scartare le porzioni di alimento meno compattate durante il caricamento, anche in assenza di alterazioni aerobiche riconoscibili. Per gli insilati in trincea queste porzioni sono costituite dalle parti superiori prossime alle spallette e per gli insilati in cumuli da tutta la parte superiore del «cappello»;
c) aumentare la profondità di avanzamento del fronte del trinciato: oltre 10 o 20 cm rispettivamente in inverno o quando la temperatura massima giornaliera supera i 15°C;
d) scoprire l'insilato sollevando il telo il meno possibile avendo cura di ricoprire il fronte con il telo stesso in caso di piogge intense;
e) destinare agli animali gli insilati ottenuti da trinciature tardive (settembre) e ai capi meno sensibili quelli ottenuti con trinciature precoci (agosto). Questo perché il contenuto di

micotossine accumulato dall'alimento in campo e nelle prime fasi dell'insilamento è maggiore con maturazioni della pianta e formazione del silo avvenute in condizioni di elevate temperature;

f) distribuire propionato (0,03-0,04%) nella porzione superiore della trincea, soprattutto qualora il prodotto insilato presenti oltre il 35% di s.s. (sostanza secca) per ovviare alle difficoltà di compattazione.

Nel caso di accertata presenza di Aflatossine nel campione o di elevata positività di campioni provenienti da aree con condizioni di coltivazione simili è necessario:

– scartare le partite di granella con alterazioni scure visibili che coinvolgano più dell'1% dei chicchi (oltre il 90% delle tossine prodotte da *Aspergillus flavus* si concentrano in essi);
– valutare con attenzione le partite con percentuali di granella rotta elevate;
– eseguire la vagliatura e la spazzolatura della granella (in questo modo si allontanano le parti che contengono la quasi totalità della AFB_1);
– mantenere la partita a temperatura inferiore a 15°C;
– evitare che nel luogo di essiccazione (silo e capannone) si formino punti a elevata umidità per stillicidio, frequenti in vicinanza delle aperture;
– trattare l'alimento contro gli insetti con prodotti specifici;
– controllare con attenzione lo stato di pulizia dei locali e dei silos in cui vengono stoccate le materie prime utilizzate nella razione. Eseguire una pulizia accurata e se necessario effettuare delle fumigazioni degli ambienti e dei silos.

Se l'AFM_1 nel latte supera i 0,05 µg/kg bisogna togliere l'alimento contaminante dalla razione, ricorrendo a un esperto in alimentazione per sostituirla. Per garantire la corretta alimentazione è necessario riformulare la razione e non sostituire semplicemente il mais con un'altra materia prima.

Dopo 2-3 giorni dall'eliminazione va ricontrollata l'AFM_1 nel latte: se il livello è sceso a valori di sicurezza il problema è risolto, altrimenti bisogna controllare gli altri componenti della razione.

Se il livello di AFM_1 nel latte non è troppo oltre i 0,05 µg/kg può essere opportuno utilizzare dei sequestranti di Aflatossine, miscelandoli con l'alimento contaminato. La miscelazione dei sequestranti deve essere molto accurata perché la loro efficacia è direttamente collegata alla possibilità di contatto tra la tossina e il sequestrante. Attenzione: l'aggiunta di sequestranti nel carro miscelatore non è efficace.

Bibliografia

1. Council for Agricultural Science and Technology. *Mycotoxin: economic and healths risks*. Ames, IA: CAST; 1989.(*Task force report* 116)
2. Whitlow LW, Hagler WMJr. Mycotoxin contamination. In: Van Horn HH, Wilcox CJ (Ed.). *Large dairy herd management*. Champaign, IL: American Dairy Science Association; 1992. p.585.
3. Coulomb RA. Jr. Biological action of mycotoxins. *Journal of Dairy Science* 1993;76:880-91.
4. Guthrie L.D. Effects of aflatoxin in corn on production and reproduction in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 1979;62 (1):134-5.
5. Bodine AB, Mertens DR. Toxicology, metabolism, and physiological effects of aflatoxins in the bovine. In: Diener UL, Asquith RL. Dickens JW (Ed.). *Aflatoxin and Aspergillus flavus in corn.* Auburn, Ala.: Department of Research Information, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, 1983. p. 46-58.

6. AOAC *Official Methods of Analysis Association. Official Analysis chemical*. 16th ed., rev. 4. Washington DC: AOAC; 1998
7. Bhandari SK, Ominski KH, Wittenberg KM, Plaizier JC. Effect of choplenght of alfalfa and corn silage on milk production and rumen fermentation of dairy cows*. Journal of Dairy Science.* 2007,90(59),2355-66,
8. Campanile G, De Filippo C, Di Palo R, Taccone W, Zicarelli L. Influence of dietary protein on urea levels in blood and milk of buffalo cows. *Livestock Production Science* 1998;55:135-43.

SVILUPPO DI UN MODELLO PER LA VALUTAZIONE DI STRATEGIE PER IL CAMPIONAMENTO OTTIMALE DEGLI ALIMENTI ZOOTECNICI: APPLICAZIONE AL CASO DELLE MICOTOSSINE

Pier Paolo Danieli, Umberto Bernabucci, Bruno Ronchi
Dipartimento di Produzioni Animali, Università della Tuscia, Viterbo

Introduzione

Il processo di analisi per la contaminazione da micotossine di qualsiasi tipologia di alimento (materia prima, prodotto alimentare o mangime) è scomponibile in tre fasi principali: campionamento, preparazione del campione e analisi (1, 2). Ad ognuna di queste fasi è associabile una diversa quota dell'errore complessivo del processo di analisi che, in termini di varianza del dato analitico, è determinato dalla somma delle varianze associate alle singole fasi (1, 3). Sia per il fatto che il campionamento rappresenta il primo passaggio, di norma non replicabile anche a distanza di breve tempo, sia per la continua riduzione dell'entità del campione nelle fasi seguenti di preparazione e analisi (anche fino ad un fattore 10^3), la sua rappresentatività è un elemento cruciale per l'affidabilità dell'intera "filiera analitica". Inoltre, la modalità con cui viene effettuato il campionamento è viepiù determinante se si tiene conto della natura (es. tossigenesi pre-raccolta *vs* post-raccolta) e della distribuzione delle contaminazioni. Nel caso delle Aflatossine (AF), la distribuzione del carico contaminante all'interno di partite di alimenti è altamente eterogenea a causa della presenza di piccole porzioni di derrata altamente contaminate (4). Whitaker *et al*. (5) hanno infatti dimostrato che, nel caso di lotti di arachidi in guscio, è comune che anche solo un'aliquota di semi inferiore all'1‰ possa essere effettivamente contaminata da AF a livelli elevatissimi. Per tali motivi, da tempo, numerose organizzazioni internazionali hanno prodotto linee guida e regolamenti nel tentativo di indicare le migliori strategie di campionamento in funzione dell'entità e tipologia delle partite, della sostanza indesiderata, dei sistemi di trasporto e di movimentazione degli alimenti (1, 6). A livello comunitario, nel caso del controllo ufficiale di mangimi e alimenti zootecnici, la modalità di campionamento è oggi armonizzata dal Reg. CE 152/2009 (7) che, pur fissando numerosità di campioni elementari, entità del campione globale e modalità di estrazione dei sub-campioni da destinare alla fase analitica, non consente di individuare per le pratiche d'autocontrollo una strategia adattabile alle esigenze dei diversi operatori della filiera agro-zootecnica (produttori, stoccatori, mangimifici, aziende zootecniche). L'obiettivo del presente contributo, è stato quello di sviluppare un modello versatile per simulare il processo di raccolta dei campioni elementari da lotti di alimenti zootecnici alla rinfusa, al fine di valutare l'effetto sulla rappresentatività campionaria del grado d'eterogeneità con cui si possono distribuire le contaminazioni da AF.

Materiali e metodi

Per la modellizzazione è stato impiegato il pacchetto *object-oriented programming* Stella 8.0 (HPS Inc., Hanover, NH, USA) per Windows. La simbologia utilizzata nello sviluppo del modello è conforme a quanto riportato da Peterson & Richmond (8). Per ragioni pratiche il modello si compone di due sub-modelli: un generatore di partite (*generatore sottopartite*) e un campionatore (*generatore campioni globali*) (Figura 1). In una prima fase, il modello prevede che la partita sia interamente suddivisa in un certo numero di Unità di Campionamento (SU) (6) il cui numero dipendente dalla tipologia di alimento (es. mais in granella), dalle dimensioni della partita e dal tipo di strumento campionatore. Nelle simulazioni effettuate, è stato scelto di operare a livello di 1 sub-partita di 10 t, definita conformemente al vigente Reg. CE 152/2009 (7) per le sostanze che possono essere distribuite in maniera non uniforme negli alimenti alla rinfusa per animali, rispetto ad un lotto standard di mais trasportato su autotreno di 30 t. Lo strumento campionatore (sonda), d'altro canto, è stato definito concettualmente di forma cilindrica e diametro idoneo (2,4 cm) per l'isolamento e raccolta di campioni elementari o incrementali (IS) di diverse materie prime: granella di mais, granaglie varie, granelle di leguminose normalmente impiegati in zootecnia (es. favino, pisello proteico).
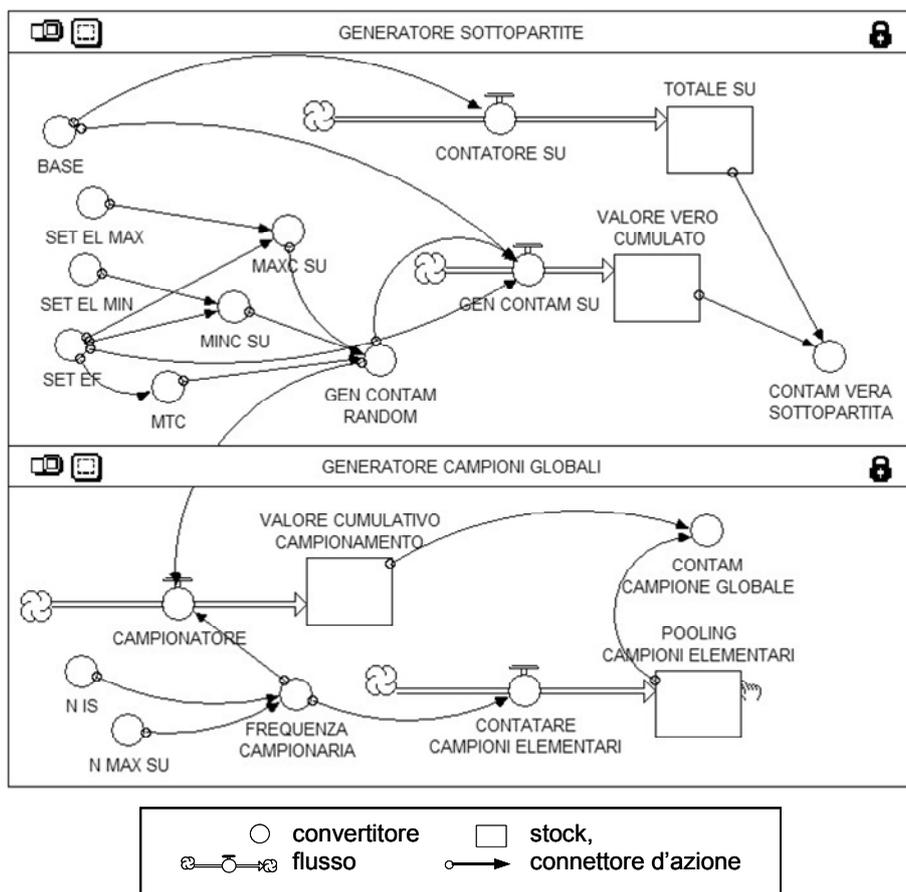
Figura 1. Layout del modello concettuale suddiviso in due sub-modelli: generatore sottopartite e generatore campioni globali

Nel presente contributo, le simulazioni sono state condotte considerando come materia prima da campionare il mais in granella destinato ad aziende agro-zootecniche, mangimifici o centri di stoccaggio di alimenti zootecnici. In tale situazione, considerando il peso ettolitrico CEE (9) della granella pari a 75,5 kg/hL, valore compatibile con le produzioni maidicole nazionali (10), e un affondamento dello strumento campionatore all'interno della massa di mais alla rinfusa trasportato su camion pari a 1,06 m, la massa di un IS ammonta a ca. 360 g, valore questo raffrontabile con quanto definito per il controllo ufficiale (7). Ogni campione incrementale così prelevato conterrebbe $\sim 1{,}4 \cdot 10^3$ cariossidi. Per il mais destinato alla zootecnia, la normativa vigente in materia di sostanze indesiderate prevede un limite massimo di 20 µg/kg (U 12%) per l'Aflatossina B_1 (AFB_1) (11) sebbene, nella prassi corrente, soventemente le partite di mais destinate alla produzione di mangimi per bovini da latte sono contrattate al fine di garantire livelli massimi di contaminazione da AFB_1 più stringenti. Per tale motivo, in tutte le simulazioni effettuate, è stato scelto un livello di contaminazione della sub-partita da campionare pari a 5 µg/kg. Nella generazione operata dal sub-modello *generatore sottopartite* (*vedi* Figura 1), inoltre, è stato tenuto conto di due aspetti:

- distribuzione della contaminazione tra le diverse SU non uniforme, ma soggetta a variabilità di livello che definisce una prima dimensione dell'eterogeneità (E_L) per cui un campione incrementale estratto dalla sub-partita può presentare una contaminazione compresa tra un valore minimo (SET EL MIN) (pari a zero, nel caso limite) e un valore massimo (SET EL MAX), nella pratica entrambi non noti *a priori*. Nel modello sviluppato, questa fonte d'eterogeneità è affidata ad un generatore di numeri casuali (GEN RANDOM CONTAM) controllabile mediante l'assegnazione di coppie di valori MINC SU, MAXC SU. Il valore di E_L è definito come il rapporto percentuale (MAXC SU-5)/5. Pertanto in base al valore scelto per il parmetro E_L nelle simulazioni, è possibile definire la massima concentrazione assegnabile ad una SU e quello minore; MINC SU = MAXC SU/2. La scelta della distribuzione casuale per questa componente della variabilità, eé stata dettata da una mancanza di adeguato consenso scientifico sul tipo di distribuzione statistica delle contaminazioni da micotossine nelle casistiche reali (12). A tale riguardo, è da sottolineare come nella pratica i vari passaggi che portano all'allestimento del carico da trasportare (stoccaggi, movimentazioni, carico) siano tutti in grado di influenzare la distribuzione finale delle contaminazioni, senza che si possa ricostruire con certezza la dinamica e valutarne gli effetti sulla distribuzione delle contaminazioni in maniera attendibile;
- non tutte le SU sono a priori assoggettabili alla condizione i); in altri termini una certa percentuale di SU distribuite casualmente all'interno della sub-partita può essere considerata AFB_1-free. Questa seconda dimensione dell'eterogeneità (E_F) nella distribuzione del carico contaminante della massa da campionare può variare tra 100% (tutte le SU sono potenzialmente contaminate) e 1/N% (una sola contaminata sul totale SU della sub-partita) (6). È infatti noto come, particolarmente nel caso delle Aflatossine, la contaminazione delle partite di materie prime alla rinfusa sia dipendente da una relativamente bassa percentuale di porzioni fortemente contaminate ("hot spots") distribuite in maniera casuale (4). La generazione di tale componente della variabilità è stata affidata ad un generatore stocastico di Monte Carlo (MTC), già utilizzato in studi analoghi (13).

L'assegnazione dei valori di E_L ed E_F alle sub-partite generate dal modello nel corso delle simulazioni, è riepilogata in Tabella 1. Complessivamente è stata simulata la generazione di 28 tipologie di sub-partita caratterizzate da livelli differenti d'eterogeneità tra un minimo (E_L5, E_F100) e un massimo (E_L100, E_F70) grado possibile. Al fine di garantire che l'assegnazione

della contaminazione alle singole SU costituenti la sub-partita presentaasse un carattere realmente casuale (*true randomess*), la generazione delle SU è stata sottoposta a verifica d'autocorrelazione per valutare eventuali periodicità del processo di creazione delle sub-partite (14). I test effettuati non hanno fatto registrare autocorrelazioni significative (coefficiente d'autocorrelazione r_K compreso tra -0,046 e 0,039, P > 0,1 per tutti i valori di *lag* compresi tra 1 ed 27644, cioè il numero di SU totali costituenti la sub-partita meno uno).

Tabella 1. Modalità di generazione delle partite a diverso grado di eterogenità nella distribuzione della contaminazione da AFB_1 (concentrazione nominale della sub-partita: 5 µg/kg)

Eterogeneità	Modo di generazione	Grado[3]						
		1	2	3	4	5	6	7
E_L	RANDOM[1]	E_L100 (100%)	E_L75 (75%)	E_L50 50%)	E_L30 (30%)	E_L15 (15%)	E_L10 (10%)	E_L5 (5%)
E_F	MONTECARLO[2]	E_F100 (100%)	E_F90 (90%)	E_F80 (80%)	E_F70 (70%)			

[1] Tutte le SU generate presentano la stessa probabilità di essere contaminate entro il range definito da due valori: MINC SU e MAXC SU (Figura 1) simmetrici rispetto al valore nominale della sub-partita (5 µg/kg).
[2] La cantaminazione dell'intera sub-partita è associata in maniera casuale ad una percentuale variabile del totale delle SU create nella simulazione, mediante generatore stocastico di Monte Carlo.
[3] Per la serie E_L100….E_L5, le copie di valori MINC SU/MAXC SU hanno assunto i seguenti valori: 10/0; 8,75/1,25; 7,5/2,5; 6,5/3,5; 5,75/4,25; 5,5/4,5; 5,25/4,75. Per la sesie E_F100…E_F70 la percentuale di SU non contaminate è assunta pari rispettivamente a: 0%, 10%, 20% e 30%.

Il campionamento è effettuato dal sub-modello GENERATORE CAMPIONI GLOBALI (*vedi* Figura 1), che sistematicamente estrae i campioni elementari e ne effettua il *pooling*. La frequenza di campionamento viene stabilita sulla base del numero di campioni elementari che devono essere estratti dalla sub-partita e il numero totale delle unità di campionamento: FREQUENZA CAMPIONARIA = N IS/N MAX SU. Le simulazioni sono state effettuare considerando la possibilità di operare estraendo 4, 8, 20 e 40 campioni incrementali (N IS) per ogni sub-partita costituita da 27645 SU. Per ogni combinazione di E_L, E_F e numero di campioni elementari (N IS), sono state effettuate 250 reiterazioni del processo di simulazione, per ognuna delle quali sono stati ottenuti valori della concentrazione di AFB_1 della sub-partita generata (CONTAM VERA SOTTOPARTITA) e dei campioni globali (CONTAM CAMPIONE GLOBALE). Per l'elaborazione dei dati sono stati impiegati il pacchetto software STATISTICA 7 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA) e il foglio di calcolo di Microsoft-Excell 2007.

Risultati e discussione

I dati ottenuti nel corso delle simulazioni sono presentati in Tabella 2. In termini generali, è riscontrabile un tendenziale decremento della dispersione dei valori di contaminazione del campione globale attorno al valore medio per ogni condizione (combinazione di E_F ed E_L) all'aumentare del numero dei campioni incrementali estratti dalla sub-partita.

Tabella 2. Valori medi, deviazione standard e CV% della contaminazione dei campioni globali ottenuti con 4, 8, 20 e 40 campioni incrementali da sub-partite generate con diverso grado di eterogeneità (E_L, E_F)

Grado	N. campioni elementari							
	4		8		20		40	
	Media±DS	CV%	Media+DS	CV%	Media±DS	CV%	Media±DS	CV%
E_F								
70%	5,00±1,03	20,6	5,00±0,76	15,2	4,99±0,49	9,8	5,00±0,34	6,7
80%	5,00± 0,89	17,8	5,00±0,65	12,9	4,99±0,43	8,6	5,00±0,29	5,9
90%	5,01±0,85	16,9	4,96±0,58	11,7	4,84±0,34	7,0	4,94±0,25	5,1
100%	5,00±0,73	14,5	5,01±0,52	10,3	4,99±0,34	6,8	5,00±0,24	4,8
E_L								
5%	5,00±0,08	1,7	5,00±0,06	1,2	5,00±0,04	0,8	5,00±0,03	0,6
10%	4,86±0,29	5,9	4,86±0,27	5,4	4,96±0,20	4,1	4,96±0,18	3,5
15%	4,88±0,35	7,1	4,87±0,31	6,3	4,94±0,27	5,6	4,88±0,26	5,4
30%	5,00±0,50	10,0	5,00±0,35	7,1	4,99±0,30	6,4	5,00±0,31	6,2
50%	4,99±0,83	16,6	5,01±0,61	12,1	4,98±0,38	7,5	5,00±0,37	7,4
75%	5,01±1,24	24,8	4,96±0,89	18,0	4,96±0,58	11,6	4,99±0,41	8,2
100%	5,01±1,65	33,0	5,02±1,21	24,0	5,00±0,79	15,9	4,99±0,54	10,9

Lo sforzo di campionamento, infatti, produce un notevole decremento del CV% per partite generate con il più elevato grado di E_F testato (E_F70, CV% da 20,6% a 6,7% passando da campioni globali di ca. 1,5 kg a 15 kg.) e di E_L (E_L100, CV% da 33% con 4 campioni elementari a 10,9% prelevandone 40) (Figura 2). Nelle condizioni di maggiore eterogeneità della sub-partita, quindi, un notevole sforzo di campionamento produce effetti consistenti nell'ottenimento di un campione globale maggiormente rappresentativo della sub-partita (Figura 2a). Nella casistica relativa alle condizioni di minore eterogeneità nella distribuzione del carico contaminante, l'aumento del numero di campioni incrementali non contribuisce altrettanto alla riduzione della variabilità del livello per i campioni globali (riduzione del CV% del 50% o meno) (Figura 2b).
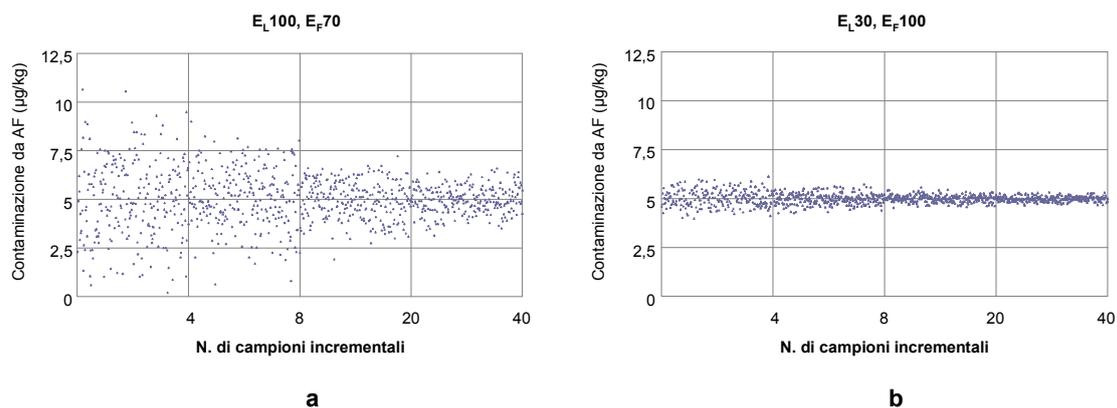
Figura 2. Stima del livello di contaminazione del campione globale (250 reiterazioni del processo di simulazione). In a) simulazioni con 4, 8, 20 e 40 campioni elementari su sub-partite generate con livelli E_L=100% ed E_F=70% (elevato grado d'eterogeneità della sub-partita); in b) stesse simulazioni effettuate su sub-partite a basso livello d'eterogeneità (E_L=30%; E_F=100%)

La possibilità di incorrere nella designazione erronea di campioni globali (conformità o non conformità del lotto rispetto al valore di riferimento, 5 µg/kg) varia considerevolmente per i piani di campionamento meno intensivi al variare del grado d'eterogeneità con cui sono generate le sub-partite (4-8 campioni incrementali) (Figura 3a-b).

Diversamente, l'aumento a 20, o meglio a 40 incrementi, consente di mantenere la variabilità della contaminazione dei campioni globali entro limiti più contenuti (CV compreso tra 10% e 20%), a svantaggio tuttavia della praticità operativa delle fasi a valle (soprattutto la preparazione del campione). Infatti, le difficoltà di manipolazione di campioni globali cospicui (nello specifico da 7,5 a 15 kg) che nella pratica corrente tendono ad essere ridotti prima della macinazione, vanificando, almeno in parte, il beneficio derivante da un elevato sforzo di campionamento. Tuttavia, i dati ottenuti indicano chiaramente che il prelievo di soli 8 campioni elementari per una sub-partita di ca. 10 t, come richiederebbe la strategia campionaria indicata dal Reg. CE 152/2009 (7), possa risultare riduttivo e comportare un errore di campionamento piuttosto consistente (CV fino al 30% nelle simulazioni effettuate) (Figure 3a e 3b). Probabilmente uno sforzo di campionamento intermedio per sub-partite da 10 t, ad esempio 16 campioni elementari, potrebbe essere da un lato fattibile con strumenti di prelievo adeguati (es. sonde pneumatiche) e, dall'altro, maggiormente rappresentativo. Ad esempio, nelle peggiori condizioni tra quelle testate in quanto ad eterogeneità della sub-partita (E_L100, E_F70) (Figura 3a), i valori del CV% sono risultati interpolabili dalla seguente funzione CV% = 0,7673·N IS$^{-0,4767}$ ($r^2 = 0,9962$; $P < 0,01$) che, per 16 campioni incrementali, consente di stimare un CV% pari a 20,4% (14,2% nel caso del livello E_F100) (Figura 3b).

Considerando che la varianza associata alla fase del campionamento può ammontare al 60-90% di quella totale dell'intero processo di analisi (1, 4), appare chiaro come un incremento accettabile dello sforzo campionario (da 8 a 16 campioni incrementali) che porti ad una riduzione di 1/3 della variabilità dei campioni globali, può avere ripercussioni notevoli a beneficio dell'affidabilità del dato finale.

a

b
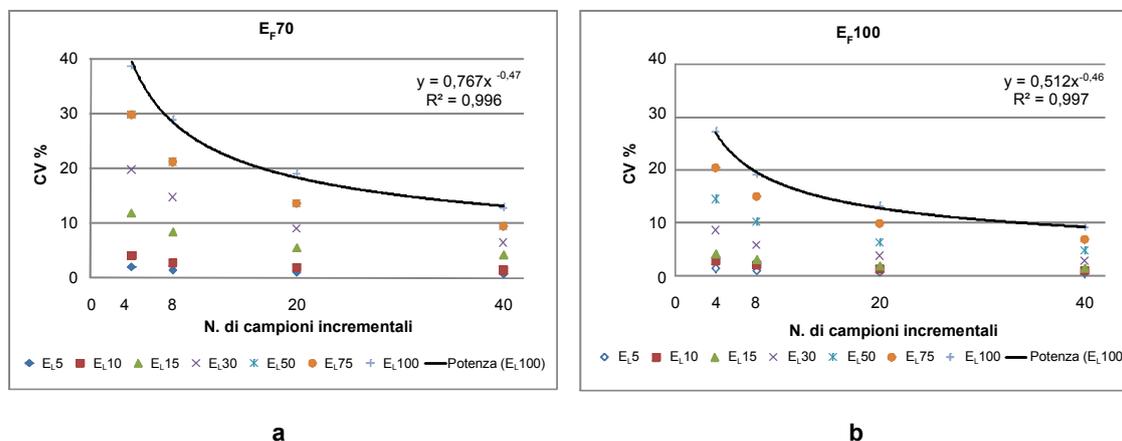
Figura 3. Pattern di variazione del CV% per campioni globali ottenuti da sub-partite a diverso grado di E_L con 4, 8, 20 e 40 prelievi di campioni elementari dalla sub-partita. In a) simulazioni con grado di E_F=70% (contaminazioni presenti nel 70% delle SU generate); in b) stesse simulazioni effettuate su sub-partite a basso livello d'eterogeneità, E_F=100%

Conclusioni

Il modello sviluppato consente di operare simulazioni che tengono conto di diverse componenti della variabilità nella distribuzione delle Aflatossine nelle partite di materie prime ad alimenti zootecnici alla rinfusa, attraverso le quali valutare l'efficacia di differenti piani o strategie campionarie. Posta la condizione che siano disponibili conoscenze più approfondite sul tipo di distribuzione statistica delle contaminazioni da Aflatossine nelle partite alla rinfusa di granella di mais (o altra materia prima ad uso zootecnico) tali da poter essere integrate nel modello sviluppato, la sua versatilità può consentire di effettuare simulazioni aderenti alla fattispecie reale, assumendo un potenziale ruolo di strumento efficace per la standardizzazione e valutazione per le strategie di campionamento degli alimenti zootecnici in grado di supportare, ad esempio, efficaci piani d'autocontrollo aziendale.

Bibliografia

1. Whitaker TB. Standardisation of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. *Food Control* 2003;14:233-7.
2. Brera C, Miraglia M. Problematiche legate alla fase analitica nella determinazione delle micotossine nei prodotti alimentari. In: Miraglia M, Brera C (Ed.). *1° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 novembre 2004. Atti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporti ISTISAN 05/42). p. 267-72.
3. Cheli F, Campagnoli A, Pinotti L, Fusi E, Dell'Orto V. Sampling feed for mycotoxins: acquiring knowledge from food. *Italian Journal of Animal Science* 2008;8:5-22.
4. Johansson AS, Whitaker TB, Hagler Jr WM, Giesbrecht FG, Young JH, Bowman DT. Testing shelled corn for aflatoxin, Part I: estimation of variance components. *Journal Of Association Of Analytical Chemists International* 2000;83:1264-9.
5. Whitaker TB, Dickens JW, Monroe RJ. Variability of aflatoxin test results. *Journal of American Oil Chemists' Society* 1974;51(5):214-8.
6. Paoletti C, Donatelli M, Kay S, Van den Eeden G. Simulating kernel lot sampling: the effect of heterogrnrity on the detection of GMO contaminations. *Seed Science and Technology* 2003;31(3):629-38.
7. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 152/2009 ella Commissione del 27 gennaio 2009 che fissa i metodi di campionamento e d'analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali. *GUCE* L 54, 26 febbraio 2009.
8. Peterson S, Richmond B, 1994. STELLA II: Technical Documentation. High Performance Systems, Hanover, NH, USA.
9. Consiglio Europeo. Direttiva 71/347/CEE del Consiglio, del 12 ottobre 1971, per il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri relative alle misurazioni del peso ettolitrico dei cereali. *GUCE* L 239, 25 ottobre 1971.
10. Corticelli C, Verderio A. Indagine poliennale sulle caratteristiche qualitative e igienico-sanitarie delle granelle commericiali di mais. In: Miraglia M, Brera C (Ed.). *1° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 novembre 2004. Atti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporti ISTISAN 05/42). p. 103-7
11. Unione Europea. Direttiva 2003/100/CE della Commissione del 31 Ottobre 2003 che modifica l'allegato I della direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali. *GUCE* L 285, 01 novembre 2003.

12. Hart LP. Variability of vomitoxin in truckloads of wheat in a wheat scab epidemic year. *Plant Disease* 1998;82(6):625-30.

13. Whitaker TB, Dickens JW, Wiser EH. Monte Carlo technique to simulate aflatoxin testing programs for peanuts. *Journal of American Oil Chemists' Society* 1976;53:545-7.

14. Box GEP, Jenkins GM. *Time series analysis: forecasting and control*. San Francisco (CA): Holden Day; 1976

LINEA GUIDA DEGLI ISTITUTI ZOOPROFILATTICI SPERIMENTALI PER LA VALIDAZIONE INTRA-LABORATORIO DEI METODI DI PROVA DI CONFERMA DELLE MICOTOSSINE NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

Loredana Annunziata (a), Alberto Biancardi (b), Giancarlo Biancotto (c), Giannina Chessa (d), Pasquale Gallo (e), Marilena Muscarella (f), Ivan Pecorelli (g), Alessandro Rosso (h), Rosanna Spatola (i), Alessandro Ubaldi (l)
(a)Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo
(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia
(c) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie,Padova
(d) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna,Sassari
(e) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, Napoli
(f) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia
(g) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia
(h) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, della Liguria e della Valle d'Aosta, Asti
(i) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo
(l) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

Introduzione

I Laboratori di Chimica degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) hanno redatto una linea guida per la validazione dei metodi di prova di conferma delle micotossine negli alimenti di origine animale (1), per definire un approccio armonizzato in conformità alla normativa vigente. I metodi di prova per la determinazione delle micotossine devono rispettare i requisiti previsti dal Reg. CE 401/2006 (2), e Reg. CE 1881/2006 (3); inoltre, devono essere validati determinando le prestazioni analitiche indicate nel Reg. CE 882/2004, allegato III (4). La linea guida rappresenta un approccio integrato, e prevede anche alcuni alcuni criteri di rendimento opzionali definiti dalla Decisione 2002/657/CE (5).

Il Reg. CE 401/2006 non indica i limiti di rivelazione dei metodi di prova, ma il Reg. CE 882/2004 prevede di calcolare limite di rivelazione (*Limit Of Detection*, LOD) e il limite di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ) del metodo. Inoltre, il Reg. CE 401/2006 prevede in maniera opzionale la possibilità di calcolare il limite di decisione CCα (Decisione 2002/657/CE), solo per tenere conto dell'incertezza di misura per valutare la conformità/non conformità del campione.

Lo scopo della linea guida è quello di definire uno schema generale di validazione dei metodi di prova di conferma per l'analisi delle micotossine, per integrare i requisiti previsti dalle norme e indicare uno schema applicativo semplice nell'ambito della rete degli IZS

Questo approccio armonizzato favorisce il confronto delle prestazioni dei metodi di prova e la loro trasferibilità tra i laboratori.

Prestazioni dei metodi di prova

I livelli di validazione, per ogni analita, sono: 0,5 – 1 – 1,5 × limite massimo (LM).

Sono eseguite almeno 2 sessioni analitiche ad almeno due settimane di distanza l'una dall'altra per la stima della precisione e del recupero del metodo, secondo lo schema: per ogni seduta analitica 6 ripetizioni per livello.

Variare, se possibile, alcuni fattori, (es. operatore, lotti di reagenti, strumento) in modo che la variabilità dei risultati sia influenzata dal maggior numero di fattori possibile, a parità di procedura analitica

I dati ottenuti usando lo Standard Interno (SI) portano a risultati già corretti per il recupero. Il recupero effettivo del metodo può essere calcolato soltanto mediante l'utilizzo di una standardizzazione esterna, eventualmente con rette in matrice per i metodi con rivelazione in spettrometria di massa, oppure mediante materiale di riferimento certificato (*Certified Reference Material*, CRM).

Criteri di rendimento

I criteri di rendimento comuni per i metodi di conferma sono:

- conferma mediante co-cromatografia
- larghezza del picco cromatografico a metà dell'altezza massima entro il 90-110%
- tempo di ritenzione: ± 2,5% per cromatografia liquida (LC), ± 0,5% per gas-cromatografia (GC)
- uso, se è disponibile, di un SI.

Cromatografia liquida-fluorimetria e cromatografia liquida- *Diode Array Detector*

Per i metodi di cromatografia liquida (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) con rivelatore fluorimetrico o con rivelatore *Diode Array* (*Diode Array Detector*, DAD) i criteri sono:

- rivelazione UV/VIS a scansione totale: λmax nello spettro dell'analita = λmax dello standard di taratura ± 2 nm. La differenza osservata tra i due spettri non è superiore, in alcun punto, al 10% dell'assorbanza dello standard di taratura.
- rivelazione fluorimetrica (FLD): si applica alle molecole che presentano fluorescenza nativa e alle molecole che presentano fluorescenza dopo trasformazione o derivatizzazione.

Cromatografia liquida-spettrometria di massa e gascromatografia-spettrometria di massa

È adottato il criterio dei punti di identificazione (*Identification Point*, IP) introdotto dalla Decisione 2002/657/CE, secondo il quale ad ogni ione diagnostico è attribuito un coefficiente. Per le sostanze di categoria B come le micotossine sono necessari 3 IP per la conferma in spettrometria di massa (MS), secondo lo schema seguente.

Tecnica MS	IP per ione
Spettrometria di massa a bassa risoluzione (LR)	1,0
LR-MS^n ione precursore	1,0
LR-MS^n prodotti di transizione	1,5

Linearità della risposta strumentale

Per valutare la linearità della risposta strumentale possono essere seguite queste indicazioni:

- *Curve di taratura in solvente*: sono calcolate riportando la [Conc] *vs* rapporto segnale dell'analita/segnale dello standard interno (SI), se si utilizza uno standard interno di riferimento quantitativo, oppure [Conc] *vs* segnale dell'analita negli altri casi. Iniettare per tre volte almeno 4 soluzioni a diversa concentrazione; nella fase di elaborazione della retta si può aggiungere, inoltre, il punto (0;0). I punti sono scelti tenendo conto dei livelli di validazione scelti e del campo di applicazione del metodo.
- *Rivelazione mediante MS*: per il calcolo delle curve di taratura utilizzare lo ione o transizione che dà il miglior rapporto segnale/rumore (S/N).

Per descrivere la formula matematica della curva di taratura calcolata utilizzare il metodo dei minimi quadrati e riportare il valore del coefficiente di correlazione (r^2). Il laboratorio stabilisce il criterio di accettabilità del valore di r^2.

Specificità

Per definizione la specificità è equivalente alla selettività ed è la capacità del metodo di non risentire delle presenza di interferenti o di altri componenti diversi dall'analita in esame

La specificità del metodo è valutata analizzando in modo indipendente almeno 20 bianchi campione, che siano rappresentativi delle matrici previste dal Piano Nazionale Residui, e dalla legislazione vigente per gli alimenti di origine animale; è suggerito lo schema seguente:

- Latte: 20 campioni di latte a scelta tra le specie animali di maggiore interesse del laboratorio ai fini dei controlli ufficiali eseguiti con maggior frequenza.
- Latte per lattanti e latte di proseguimento: 20 campioni a scelta tra le varie tipologie disponibili.
- Alimenti per lattanti e di proseguimento, alimenti dietetici a fini medici speciali destinati specificamente ai lattanti: 20 campioni a scelta tra le varie tipologie disponibili, esclusi quelli a base di pesce, di frutta e di vegetali.
- Formaggi: 20 campioni a scelta tra le varie tipologie disponibili
- Muscolo: 20 campioni di muscolo suino.

Verificare l'assenza di interferenti significativi nell'intervallo di tolleranza massima definita per il tempo di ritenzione dell'analita rispetto ad un campione fortificato. È ammesso che al massimo il 5% dei campioni analizzati dia un segnale significativo interferente con la rivelazione e/o identificazione dell'analita. Ciò significa che l'errore β del metodo è <5%, e la presenza dell'analita nel campione è rivelata con una probabilità > 95%.

Esattezza

Per quanto riguarda l'esattezza, si consiglia di seguire queste indicazioni:

- eseguire l'analisi quantitativa per ogni sessione analitica
- calcolare il recupero per ogni prova effettuata, per tutti i livelli di fortificazione
- calcolare il recupero medio e il suo scarto tipo per ogni livello di validazione, e verificare che i valori del recupero medio ottenuti soddisfino i criteri riportati nella legislazione, in funzione del livello di fortificazione effettuato

Precisione

È espressa mediante alcuni parametri:

– *in condizioni di ripetibilità*
    - s_r : scarto tipo o deviazione standard calcolata
    - ripetibilità: $r = 2,8 \times s_r$
    - deviazione standard relativa (*Relative Standard Deviation*) $RSD_r = (s_r/\text{valore medio}) \times 100$
– *in condizioni di riproducibilità*
    - s_R : scarto tipo o deviazione standard calcolata
    - riproducibilità: $R = 2,8 \times s_R$
    - deviazione standard relativa $RSD_R = (s_R/\text{valore medio}) \times 100$
    - riproducibilità intra-laboratorio S_r: è misurata all'interno dello stesso laboratorio, con lo stesso metodo, sullo stesso materiale da saggio, da differenti operatori, strumenti, ad intervalli di tempo relativamente lunghi.

Per il calcolo eseguire l'analisi quantitativa per ogni sessione analitica, poi verificare la normalità dei dati ottenuti ed escludere eventuali outliers.

Per ogni sessione di lavoro e ogni livello di fortificazione calcolare il valore medio, lo scarto tipo (s_r) e l'RSD_r.

Effettuare, per ciascun livello, un'analisi della varianza (ANOVA) tra le sedute di validazione. Calcolare, quindi, lo scarto tipo di ripetibilità (s_r) e di riproducibilità intra-laboratorio (S_r).

Calcolare i valori di RSD di ripetibilità e riproducibilità intra-laboratorio

Verificare che i valori di RSD_r soddisfino i criteri riportati nella legislazione, in funzione del livello di fortificazione effettuato.

Limite di rivelazione

Il LOD è la minima quantità rivelabile in base al rapporto segnale/rumore (S/N):

$$LOD = 3,3 \times s_a / b \qquad \text{oppure} \qquad LOD = 3,3 \times \sigma_B / b$$

dove:

a = intercetta retta media dei recuperi
b = coefficiente angolare retta media dei recuperi
s_a = scarto tipo dell'intercetta
σ_B = scarto tipo del segnale dei bianchi campione

Limite di quantificazione

Il LOQ è la capacità del metodo di eseguire una misurazione quantitativa.

È verificato sperimentalmente, durante lo sviluppo del metodo, eseguendo 6 prove di recupero dell'analita ad una concentrazione uguale o superiore a :

$$LOQ = 5 \times s_a / b \qquad \text{oppure} \qquad LOQ = 5 \times \sigma_B / b$$

Incertezza

L'incertezza di misura standard dei metodi idonei ai fini del controllo ufficiale deve essere inferiore alla massima incertezza di misura standard calcolata mediante la formula:

$$\mathrm{Uf} = \sqrt{[(LOD/2)^2 + (\alpha C)^2]}$$

dove:

Uf = incertezza massima di misura standard (µg/kg)
LOD = limite di rivelazione del metodo (µg/kg)
C = concentrazione di interesse (µg/kg)
α = fattore numerico funzione di C secondo lo schema riportato in Tabella 1.

Tabella 1. Fattore numerico α in funzione della concentrazione C da utilizzare nel calcolo di Uf

C (µg/kg)	α
≤ 50	0,20
51-500	0,18
501-1000	0,15
1001-10 000	0,12
≥ 10 000	0,10

Limiti del Reg. CE 401/2006

I valori di precisione raccomandati (Tabella 2) dal Regolamento n. 401/2006/CE sono calcolati mediante l'equazione di Horwitz:

$$RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)} = (s_R / \text{valore medio}) \times 100$$

dove: C = frazione di massa espressa come potenza adimensionata di 10.

Tabella 2. Esempi di RSD_R

Concentrazione	RSD_R raccomandato (%)	RSD_r raccomandato ($0,66 \times RSD_R$) (%)
0,025 µg/kg	78,8	52,0
0,050 µg/kg	71,0	46,9
0,100 µg/kg	64,0	42,2
0,450 µg/kg	51,0	33,7

Esempio applicativo

Risultati di 6 misure dell'Aflatossina M_1 nel latte :
valore medio = 46,0 pg/g (ng/kg) scarto tipo s_r = ± 7,0 pg/g

Applicando le equazioni descritte in precedenza:
RSD_R (riproducibilità) raccomandato = 71,9%

RSD_r raccomandato = 0,66 × RSD_R = 0,66 × 71,9% = 47,5%
Scarto tipo di ripetibilità raccomandato = s_r = RSD_r× (valore medio)/100 = 0,4745 × 46 = 21,8 pg/g (da confrontare con ± 7,0 pg/g)

I valori di RSD_R massimo e RSD_r massimo calcolati sono non realistici e inapplicabili.

In alternativa, il laboratorio può utilizzare l'approccio di Thompson, utilizzando, per concentrazioni < 0,12 mg/kg l'equazione:

RSD_R (riproducibilità) = 23,0%

Esempio applicativo

RSD_R (riproducibilità) massimo = 2 × 23,0% = 46,0%
RSD_r (ripetibilità) massimo = 2 × 0,66 × RSDR = 2 × 0,66 × 23,0% =30,4%
Scarto tipo di ripetibilità massimo = s_r = RSD_r · $valore_{medio}$ /100 = 0,304 × 46 = 14,0 pg/g (da confrontare con il valore ± 7,0 pg/g ottenuto sperimentalmente)

Conclusioni

La linea guida degli IZS consente un approccio armonizzato alla validazione e alla definizione delle prestazioni analitiche dei metodi prova per l'analisi delle micotossine. Questo approccio rende anche più facile la trasferibilità dei metodi tra diversi laboratori.

Sono stati integrati i requisiti previsti dal Reg. CE 882/2004 (norma orizzontale) con quelli del Reg. CE 401/2006 (norma verticale), indicando criteri ben definiti per la valutazione della specificità, della precisione, del calcolo di LOD e LOQ, della linearità della risposta strumentale.

La linea guida è parte integrante delle procedure del sistema qualità aziendale degli IZS, e in alcuni Istituti è stata estesa anche alla validazione dei metodi di prova per l'analisi delle micotossine negli alimenti ad uso umano e ad uso zootecnico.

Bibliografia

1. Gruppo di lavoro dei Laboratori di Chimica degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali. *Linea guida per la validazione intra-laboratorio dei metodi di prova di conferma per la determinazione delle Sostanze di Categoria B - SEZIONE 4 – MICOTOSSINE*. 2007.
2. Unione Europea. Regolamento 401/2006/CE of 23 Febraury 2006, laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal* L 70, 9 marzo 2006.
3. Unione Europea. Regolamento 1881/2006/CE of 19 December 2006, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal* L 364, 20 dicembre 2006.
4. Unione Europea. Regolamento 882/2004/CE of 29 April 2004, on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules, *Official Journal* L 191, 28 maggio 2004.
5. Unione Europea. Decisione 2002/657/CE of 12 August 2002, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Official Journal* L 221, 17 agosto 2002.

DEOSSINIVALENOLO NEL FRUMENTO DURO (*TRITICUM DURUM* DESF.): CONFRONTO FRA COLTURA CONVENZIONALE E BIOLOGICA

Gabriella Aureli (a), Fabrizio Quaranta (a), Tiziana Amoriello (b), Sahara Melloni (a),
Ersilio Desiderio (a), Mauro Fornara (a), Maria Grazia D'Egidio (a)
(a) Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali, Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Roma
(b) Direzione Centrale Attività Scientifica Servizio Trasferimento e Innovazione, Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Roma

Introduzione

Negli ultimi anni il crescente interesse dei consumatori verso gli alimenti biologici ha creato una tendenza di mercato che privilegia gli aspetti qualitativi e nutrizionali-salutistici dei prodotti alimentari con particolare riguardo a quelli igienico-sanitari legati alla sicurezza d'uso. Il metodo di coltivazione biologico è ampiamente utilizzato in Italia per realizzare colture cerealicole, la quota più consistente delle quali è costituita dal frumento duro (1) che trova principale impiego nella trasformazione in pasta alimentare. Visti i suoi forti consumi pro-capite, risulta di particolare importanza l'acquisizione di elementi conoscitivi in merito alla possibile assunzione di sostanze "contaminanti" estranee alla materia prima (2). Tra queste ultime sono comprese le micotossine, prodotti del metabolismo secondario dei funghi che possono avere effetti dannosi nell'uomo e negli animali. I funghi produttori di tali composti, che maggiormente interessano le colture di frumento, appartengono al genere *Fusarium*. In particolare le specie *F. graminearum* e *F. culmorum* risultano le più comuni produttrici di Deossinivalenolo (DON), fusariotossina di tipo tricotecenico (3-5). Sulla base della valutazione del rischio di esposizione dei consumatori e considerata l'impossibilità di eliminare completamente il DON, e più in generale le micotossine, sia dalla materia prima che dai prodotti finiti, le azioni di prevenzione e contenimento, con la definizione dei limiti ammissibili di contaminazione (6, 7) rappresentano strumenti idonei per la tutela della salute. Il limite massimo di concentrazione di DON ammissibile per il frumento duro non trasformato è stato stabilito con questo regolamento pari a 1750 ng/g.

Il frumento duro manifesta una più marcata suscettibilità, rispetto al tenero, sia verso i funghi responsabili della fusariosi della spiga sia all'accumulo del DON nelle cariossidi (8, 9). Il metodo di coltivazione biologico con l'impossibilità di ricorrere a fitofarmaci per il controllo dei funghi patogeni, ha posto il problema dell'eventuale aumento dei livelli di contaminazione da micotossine rispetto al metodo convenzionale.

Allo stato attuale, dai lavori riportati in letteratura su questo argomento non è possibile trarre una risposta conclusiva sull'effetto del metodo di coltivazione nel determinare il grado di contaminazione da DON (10-15).

Lo scopo del presente lavoro, è stato quello di confrontare nel biennio 2007-2008 il comportamento di varietà di frumento duro coltivate sia con metodo convenzionale che biologico in ambienti uguali, o paragonabili dal punto di vista pedo-climatico, al fine di valutare quanto i diversi fattori presi in esame (varietà, anno, metodo di coltivazione e areale) potessero incidere sul livello di contaminazione da DON.

Materiali e metodi

I campioni sono stati reperiti nell'ambito delle Reti Nazionali di confronto varietale in convenzionale (16) e in biologico (17) in otto località rappresentative di alcune aree nelle quali è maggiormente diffusa la coltura del frumento duro, quattro al Centro (Jesi-AN, Pollenza-MC, Papiano-PG, Alberese-GR) e quattro al Sud (Campobasso, Foggia, S. Stefano Quisquina-AG e Catania).

Sono state prese in esame sei varietà con caratteristiche diverse in relazione al ciclo biologico (P-precoci, M-medie e T-tardive): Ciccio (P), Simeto (P), Duilio (P), Iride (MP), Claudio (M) e Creso (T). La valutazione dei livelli di contaminazione da DON è stata effettuata nell'ambito del progetto interregionale MICOCER per quanto attiene al metodo convenzionale e del progetto BIOCER del MiPAAF per quanto riguarda il metodo biologico. I campioni di granella sono stati macinati con mulino Cyclotec (PBI), con una griglia da 0,5 mm. e l'analisi è stata effettuata sullo sfarinato integrale mediante metodica immunoenzimatica (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA) utilizzando il kit Ridascreen®-DON, R-Biopharm. A tal fine è stato utilizzato il preparatore automatico BRIO (SEAC) e il lettore per micropiastre SIRIO (SEAC). Il limite di sensibilità del metodo è pari a 18,5 ng/g, con un intervallo di linearità fino a 500 ng/g; il recupero di tossina nei cereali è compreso fra l'85 e il 110%. I risultati rappresentano il valore medio di analisi ripetute (n= 2; CV $\leq$ 10%).

Per valutare statisticamente il grado di influenza dei diversi fattori (varietà, anno, tipo di coltivazione, areale) sui livelli di contaminazione da DON è stato utilizzato un modello lineare generalizzato basato sulla distribuzione di Poisson e funzione di link data dal logaritmo: Log (DON) = varietà+anno+areale+coltivazione.

Risultati e discussione

Il modello statistico utilizzato (Tabella 1) è risultato altamente significativo (p<0,0001) ed ha permesso di valutare il grado di influenza dei quattro fattori (varietà, anno, tipo di coltivazione e areale) sui livelli di contaminazione da DON nei campioni di frumento duro. L'areale è stato il fattore predominante con una "incidenza" sulla devianza totale pari al 40%, seguito poi dall'anno e dal metodo di coltivazione (30% e 20% rispettivamente). La scelta varietale è risultata la meno influente (10%), anche se non trascurabile, essendosi verificata una risposta significativamente differente (p<0,0001) tra le sei varietà relativamente al grado di suscettibilità al DON.

Tabella 1. Modello lineare generalizzato Log (DON) = varietà + anno + coltivazione + areale

Parametri caratterizzanti	Valore statistico	Significatività (p)
Devianza	19795	
Log-verosimiglianza	48000	
χ^2	24157	<0,0001
χ^2 (varietà)	1192	<0,0001
χ^2 (anno)	3646	<0,0001
χ^2 (coltivazione)	2461	<0,0001
χ^2 (areale)	4932	<0,0001

I risultati ottenuti dall'analisi dei campioni provenienti dalle otto località considerate hanno fornito un quadro generale caratterizzato da bassi livelli di contaminazione da DON. Infatti i valori medi e massimi dei campioni positivi, registrati nel biennio 2007-2008 non hanno superato il limite massimo consentito (1750 ng/g), ad eccezione di un solo campione di Duilio (1894 ng/g) in coltivazione convenzionale (Figura 1).
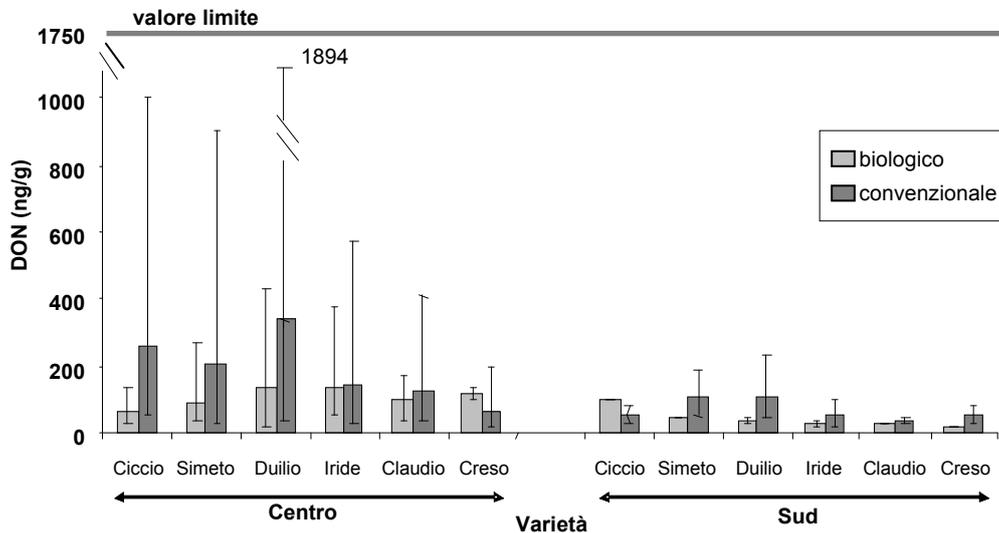
Figura 1. Valori medi, massimi e minimi della concentrazione di DON nei campioni positivi delle sei varietà comuni di frumento raggruppate in due macroareali nel biennio 2007-2008

Nella Figura 2 si evidenzia la differenza di contaminazione fra i due anni di prova dovuta probabilmente alle caratteristiche climatiche dell'annata 2008, più favorevoli allo sviluppo della fusariosi della spiga. La risposta varietale in merito all'accumulo di DON è stata piuttosto differenziata: in particolare la varietà Creso si è distinta come la meno suscettibile anche nelle condizioni più difficili e cioè nell'annata 2008 e in coltura convenzionale.
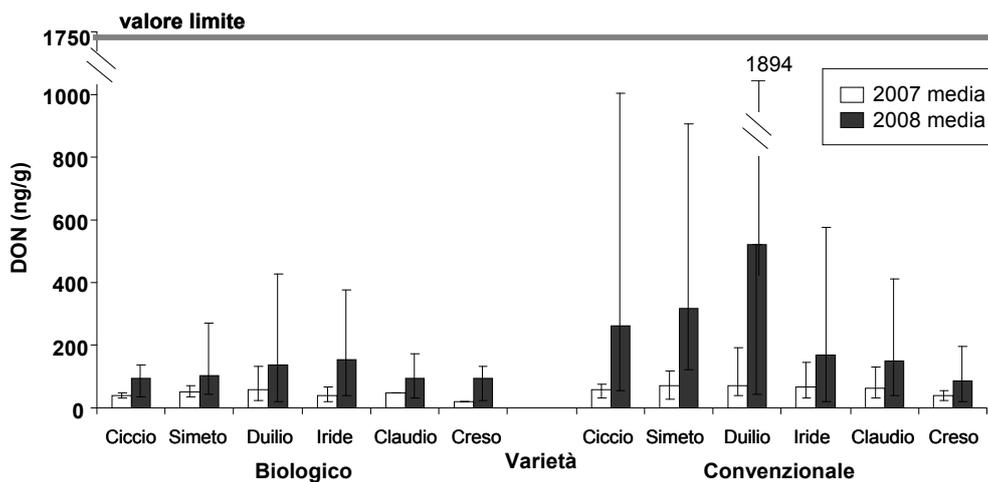
Figura 2. Valori medi, massimi e minimi della concentrazione di DON nei campioni positivi delle sei varietà comuni di frumento coltivate con metodo biologico e convenzionale (2007- 2008)

Anche per quanto riguarda l'incidenza percentuale di contaminazione da DON (Figura 3) le sei varietà hanno evidenziato un comportamento differenziato con una minore incidenza in biologico. Le varietà Claudio e Creso hanno fatto registrare una minore percentuale di contaminazione con entrambi i metodi di coltivazione.
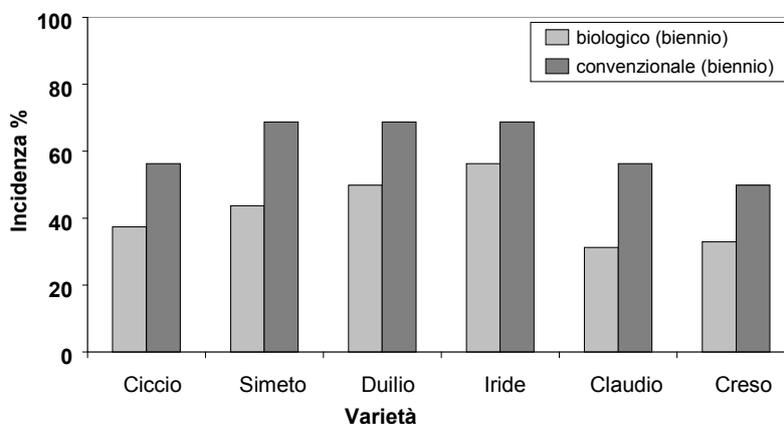
Figura 3. Incidenza % (n. positivi/ n. totale x 100) della contaminazione da DON nelle sei varietà di frumento durante il biennio 2007-2008

Inoltre, osservando più nel dettaglio (Figura 4) il comportamento delle varietà nei due areali di coltivazione (Centro e Sud), sono risultati evidenti livelli di incidenza percentuale nettamente più elevati nelle zone del Centro, dove Simeto e Duilio hanno raggiunto il 100% nel convenzionale, rispetto a quelle del Sud dove il valore massimo è stato pari al 50% per la varietà Iride in entrambi i tipi di coltivazione e per Ciccio solo in convenzionale.
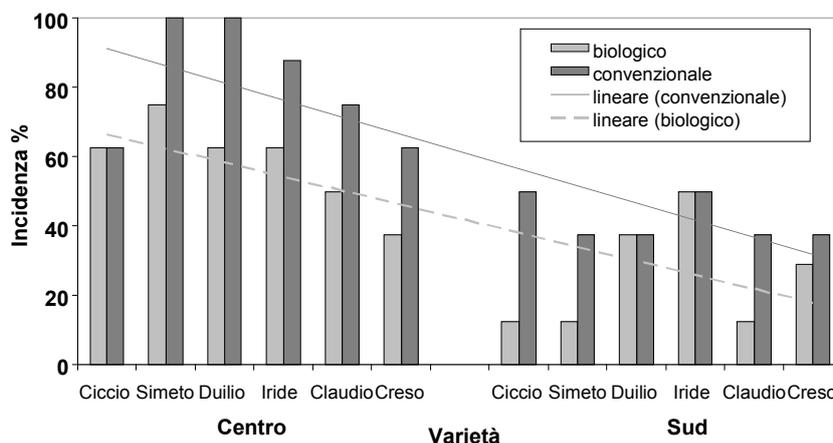
Figura 4. Incidenza % (n. positivi / n. totale x 100) della contaminazione da DON nelle sei varietà di frumento, durante il biennio 2007-2008, negli areali Centro e Sud

Oltre all'andamento meteorologico dell'annata anche le caratteristiche ambientali relative alle zone di coltivazione rappresentano un fattore di rilievo nell'influenzare sia l'incidenza sia il grado di contaminazione da DON del frumento duro. Infatti, come illustrato nella Figura 5 relativamente ai campioni positivi, nell'areale Centro sono stati ottenuti i livelli più alti sia per quanto riguarda i valori medi di contaminazione (106 ng/g in biologico e 201 ng/g in convenzionale) che massimi (428 ng/g in biologico e 1894 ng/g in convenzionale), mentre nel Sud il valore massimo non ha superato i 233 ng/kg nel convenzionale.
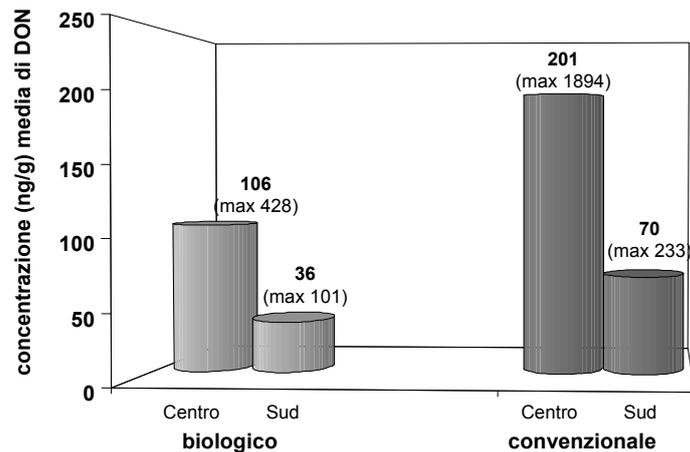
Figura 5. Valori medi dei campioni positivi nel biennio 2007-2008 (tra parentesi valori massimi della serie) negli areali Centro e Sud

In modo analogo si è manifestato l'andamento dell'incidenza percentuale, ovvero (n. positivi /n. totale) x 100, dei riscontri positivi sul totale dei campioni analizzati nel biennio (Figura 6): nell'areale Centro si sono raggiunti i livelli più elevati sia in biologico (58%) che in convenzionale (81%) rispetto al Sud, dove il valore massimo dei positivi non ha superato il 50% con entrambi i sistemi colturali.
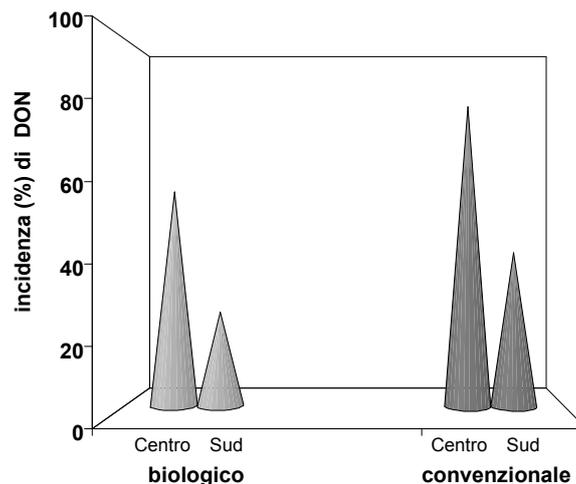
Figura 6. Incidenza % dei campioni positivi nel biennio 2007-2008 negli areali Centro e Sud

Conclusioni

Dall'insieme dei risultati ottenuti durante il biennio di sperimentazione è possibile trarre alcune indicazioni relative ai fattori studiati:

- le caratteristiche climatiche dell'annata agraria e l'areale di coltivazione rappresentano i fattori di incidenza più importanti sul livello di contaminazione da DON;
- il frumento duro è maggiormente suscettibile all'accumulo di DON al Centro rispetto al Sud, dove peraltro i livelli di micotossina sono molto contenuti;
- il metodo di coltivazione è risultato avere minore importanza nell'influenzare il livello di contaminazione, ma con risultati sempre migliori adottando tecniche biologiche;
- la scelta varietale è risultata il fattore di minor peso, comunque significativo e legato all'espressione genetica di diversi livelli di suscettibilità. Le *cultivar* Creso e Claudio hanno evidenziato livelli di contaminazione più bassi.

In conclusione, il lavoro svolto ha fornito dei risultati che possono avere una ricaduta positiva nell'approccio ai problemi relativi alla valutazione del rischio di contaminazione da micotossine.

L'ipotesi di maggiori livelli di DON nei campioni di frumento duro in coltura biologica sembrerebbe non suffragata dai risultati sperimentali di questo lavoro svolto in più ambienti e anni, anzi si è verificata una minor contaminazione rispetto al convenzionale.

È stata inoltre confermata l'importanza della vocazionalità delle zone meridionali e insulari italiane per la coltivazione del frumento duro, coltura insostituibile per l'economia locale.

Le buone tecniche agronomiche, obbligatorie di fatto nei disciplinari biologici, sono elementi di primaria importanza per il contenimento delle fusariosi e quindi delle relative micotossine, al fine di ottenere una materia prima con elevate caratteristiche qualitative, soprattutto per quanto riguarda gli aspetti igienico-sanitari, che della qualità costituiscono il requisito più importante.

Bibliografia

1. D'Egidio MG, Aureli G, Quaranta F, Cecchini C, Melloni S, Moscaritolo S. Safety and quality of durum wheat from organic crop in Italy. *Tecnica Molitoria International* 2009;60 (10/A):79-88.
2. Unione Europea. Regolamento (CEE) dell'8 febbraio 1993, n. 315 che stabilisce le procedure comunitarie relative ai contaminanti nei prodotti alimentari. *GUCE* L. 37, 13 febbraio 1993.
3. Edwards SG, Barrier-Guilliot B, Clasen P-E, Hietaniemi V, Pettersson H. Emerging issues of HT-2 and T-2 toxins in European cereal production. *World Mycotoxin Journal* 2009; 2:173-9.
4. Miller JD. Mycotoxins in small grains and maize: Old problems, new challenge. *Food Additives and Contaminants* 2008;25(2):219-30.
5. Rocha O, Ansari K, Doohan FM. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives and Contaminants* 2005;22(4):369-78.
6. Unione Europea. Regolamento (EC) n. 1881 del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *GUCE* L. 364/5, 20 dicembre 2006.
7. Unione Europea. Raccomandazione n. 583 del 17 agosto 2006 sulla prevenzione e sulla riduzione delle *Fusarium*-tossine in cereali e prodotti derivati. *GUCE* L. 234/35, 29 agosto 2006.
8. Romani S, Pinnavaia GG, Dalla Rosa M. Caratteristiche qualitative e presenza di micotossine in grano duro infetto da *Fusarium* spp. *Tecnica Molitoria*, giugno 2005:617-24.
9. Campagna C, Haidukowski M, Pancaldi D, Pascale M, Ravaglia S, Silvestri M, Visconti A. Fonti di rischio e gestione delle micotossine nel frumento. *L'Informatore Agrario* 2005;1:39-47.

10. Edwards SG. *Fusarium* mycotoxin content of UK organic and conventional wheat. *Food Additives and Contaminants* 2009;26(4):496-506.
11. Vànovà M, Klem K, Mìsa P, Matusinsky P, Hajslova J, Lancova K. The content of Fusarium mycotoxins, grain yield and quality of winter wheat cultivars under organic and conventional cropping system. *Plant, Soil and Environment* 2008;54:395-402.
12. Pussemier L, Pie´Rard JY, Anselme M, Tangni EK, Motte JC, Larondelle Y. 2006. Development and application of analytical methods for the determination of mycotoxins in organic and conventional wheat. *Food Additives and Contaminants* 2006; 23(11):1208-18.
13. Koch HJ, Pringas C, Maerlaender B. Evaluation of environmental and management effects on Fusarium head blight infection and deoxynivalenol concentration in the grain of winter wheat. *European Journal of Agronomy* 2006;24:357-66.
14. Pussemier L, Larondelle Y, Van Peteghem C, Huyghebert A. Chemical safety of conventionally and organically produced foodstuff: a tentative comparison under Belgian conditions. *Food Control* 2004;17:14-21.
15. Tamm L, Thurig B. FiBL position papers: mycotoxins in organic food. *Ecology and Farming* 2002;4.
16. Desiderio E, Belocchi A, D'Egidio MG, Fornara M, Cecchi V, Cecchini C, Aureli G, Flavoni A. Risultati della sperimentazione nazionale 2007-08. Varietà di duro alla prova per le semine 2008. *L'Informatore Agrario 2008*;64 (34)(Suppl.):20-5.
17. Quaranta F, Belocchi A, Camerini M, D'Egidio MG, Fornara M, Melloni S. Le varietà per il grano duro bio. Risultati del 6° anno di prove. *L'Informatore Agrario* 2008;64(37):66-71.

MONITORAGGIO DELLA GESTIONE DEL RISCHIO CONTAMINAZIONE DA AFLATOSSINE SULLE AZIENDE CONSERVIERE DELLA PROVINCIA DI IMPERIA CHE UTILIZZANO ANACARDI

Marta Ferro (a), Lorella Terzano (b)
(a) Dipartimento Provinciale di Genova, Agenzia Regionale Protezione Ambiente Liguria, Genova
(b) Struttura Complessa Igiene degli Alimenti e della Nutrizione, ASL 1 Imperiese, Imperia

Introduzione

La noce di anacardio è il seme oleoso dell'*Anacardium Occidentale L.*, pianta tropicale originaria del Brasile Nord Orientale. I maggiori produttori di anacardi sono il Vietnam, l'India, il Brasile, il Mozambico e la Tanzania mentre i maggiori importatori sono gli USA, l'Europa e il Giappone. La noce viene utilizzata dall'industria alimentare nella preparazione di snack, salse e condimenti; viene normalmente commercializzata come tale o in farina

È documentato il rischio di contaminazione degli anacardi con funghi del genere *Aspergillus* durante la coltivazione e le fasi di post-raccolta, a causa delle condizioni climatiche caldo umide dei Paesi di origine abbinate a pratiche colturali e tecniche di stoccaggio inadeguate (1) e la conseguente presenza di Aflatossine nelle noci e nei prodotti derivati reperibili in commercio (2).

L'Aflatossina B_1 (AFB_1) è l'Aflatossina dotata di maggior tossicità inserita dalla *International Agency for Research on Cancer* (IARC) nel Gruppo 1 (sostanze sicuramente cancerogene per l'uomo).

L'elevata tossicità della AFB_1 ha portato a non definire livelli di assunzione tollerabili, ma a consigliare, come indicato dal *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA) che l'esposizione debba essere la più bassa possibile (principio dell'ALARA, "*As Low as Reasonably Achievable*").

La legislazione europea con il Reg. CE 1881/2006 (3) ha stabilito per la frutta secca e a guscio e i relativi prodotti di trasformazione, destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari, un Tenore Massimo di 2 µg/kg per AFB_1 e 4 µg/kg per la somma delle Aflatossine B_1, B_2, G_1 e G_2, mentre per i prodotti alimentari trasformati e composti rimanda alla determinazione di un Limite Massimo Tollerabile calcolato sulla base di specifici fattori di conversione che devono essere forniti dall'operatore del settore alimentare all'autorità di controllo che li richieda.

L'art.3 del Reg. CE 1881/2006 sancisce inoltre il divieto di utilizzo nei prodotti alimentari di ingredienti che risultassero contaminati oltre i limiti sopra riportati e la miscelazione di partite conformi con altre non conformi.

Nel 2008 il *Codex Alimentarius* ha proposto un limite massimo di 10µg/kg per le Aflatossine totali in mandorle, nocciole e pistacchi pronti al consumo e la Commissione Europea sta valutando la possibilità di allineare la legislazione della UE a questo valore; a tale proposito l'EFSA (*European Food Safety Authority*) si è espressa con due opinioni del panel scientifico CONTAM (4, 5) la più recente delle quali (pubblicata nel giugno 2009) comprende anche la noce di anacardio e i suoi derivati; in entrambe le opinioni viene ritenuto accettabile l'innalzamento del limite in questione per tutta la frutta a guscio senza pregiudizio per la salute

dei consumatori della UE, mentre viene puntualizzata la necessità di ridurre il numero di alimenti altamente contaminati immessi sul mercato.

Attualmente l'importazione di anacardi e derivati da paesi terzi non è soggetta alle condizioni particolari di controllo ai punti d'ingresso che sono state invece previste per altra frutta secca e a guscio dalla Decisione della Commissione 2006/504/CE del 12.07.2006, relativamente al rischio di contaminazione da Aflatossine a seguito della frequente rilevazione di partite irregolari (6).

Obiettivi e metodi

Nell'anno 2007 controlli operati dal Nucleo Antisofisticazioni e Sanità (NAS) presso importatori di Genova hanno portato a segnalazioni di non conformità, per presenza di Aflatossine superiori ai limiti previsti, di diverse partite di farina di anacardi di origine vietnamita. Sulla base di queste segnalazioni e in considerazione che tale ingrediente risultava utilizzato presso le numerose aziende conserviere a carattere prevalentemente artigianale e piccolo industriale del territorio della provincia di Imperia, a partire dal 2008 la Struttura Complessa Igiene degli Alimenti e della Nutrizione della Azienda Sanitaria Locale (ASL) 1 Imperiese ha introdotto nel proprio piano di controllo ufficiale degli alimenti un programma di audit per la verifica delle procedure permanenti basate sul sistema *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP) adottate da queste aziende al fine di limitare il rischio di utilizzo di materie prime contaminate, con particolare riguardo al rischio Aflatossine proveniente dagli anacardi e dall'altra frutta a guscio eventualmente utilizzata; tale controllo è risultato abbinato in un primo approccio, al campionamento di prodotti finiti, contenenti l'ingrediente in questione, che sono stati destinati alla ricerca di AFB_1 e totali al fine di ottenere un quadro il più possibile rappresentativo della situazione di questi prodotti locali relativamente alla problematica in questione.

Il condimento prodotto più comunemente dalle aziende locali risulta il pesto alla genovese la ricetta tradizionale del quale prevede basilico, olio extravergine di oliva, formaggio (parmigiano, grana padano o pecorino), aglio, pinoli, noci (facoltative), sale; l'utilizzo degli anacardi, in abbinamento o in sostituzione dei pinoli, discende per lo più da ragioni economiche e in taluni casi anche tecnologiche (diminuzione dell'acqua libera).

Al momento (settembre 2009), sono state visitate 18 aziende locali presso 13 delle quali è stato verificato l'utilizzo delle noci di anacardi generalmente acquistate in frammenti o come farina; presso ogni azienda si è proceduto all'esame dell'analisi dei rischi effettuata nel piano di autocontrollo e alla verifica della presenza di documentazione inerente i lotti di anacardi acquistati (documenti di trasporto, specifiche tecniche, certificazioni rilasciate dai paesi di origine, ulteriori certificazioni analitiche fornite dall'importatore o commissionate dall'azienda a laboratori esterni) e dei piani dei controlli previsti sulla materia prima e sui prodotti finiti, richiedendo, laddove necessario, l'adozione di specifiche azioni correttive e/o preventive finalizzate alla corretta gestione del rischio d'introduzione in produzione di anacardi contaminati da Aflatossine. Si è proceduto, inoltre, alla acquisizione del dato relativo alla percentuale di anacardi utilizzata nelle preparazioni, che di solito non viene dichiarata in etichetta in quanto nelle preparazioni esaminate gli anacardi non costituiscono ingrediente caratterizzante.

Sono stati prelevati 28 campioni di prodotti finiti dei quali n. 22 pesti di basilico e n. 6 salse di noci tutti contenenti fra gli ingredienti gli anacardi, utilizzati da soli (n.5 campioni) o con altra frutta a guscio (pinoli o noci varietà *Juglans regia*); la percentuale di utilizzo degli anacardi da parte delle diverse aziende è risultata variabile dal 4% al 35% circa mentre i pinoli,

presenti in 17 dei 22 pesti, sono risultati utilizzati in percentuale generalmente molto esigua (valore medio 1,3%) e le noci (utilizzate nella sola salsa di noci) in percentuale fra il 17 e il 56%.

Il campione globale è stato effettuato presso ogni azienda facendo riferimento alla dimensione della partita prodotta.

I campioni sono stati analizzati dal laboratorio del Dipartimento di Genova dell'Agenzia Regionale Protezione Ambiente Liguria (ARPAL) in cromatografia liquida ad alta risoluzione con rilevazione fluorimetrica previa derivatizzazione post colonna e purificazione in colonna di immunoaffinità.

Risultati

Sono risultati positivi per Aflatossine n. 24 dei 28 campioni analizzati con una incidenza di contaminazione pari all'86% (limite di rivelazione: 0,015 µg/kg); i valori massimi riscontrati sono stati rispettivamente 1,6 µg/kg per AFB_1 e 2,5 µg/kg per le Aflatossine totali (somma di B_1, B_2,G_1 e G_2); n. 11 campioni (39%) presentano un range di contaminazione per AFB_1 compreso fra 0,1 e 0,5 µg/kg e n. 4 campioni (14%) valori superiori a 1,0 µg/kg (Figura 1).
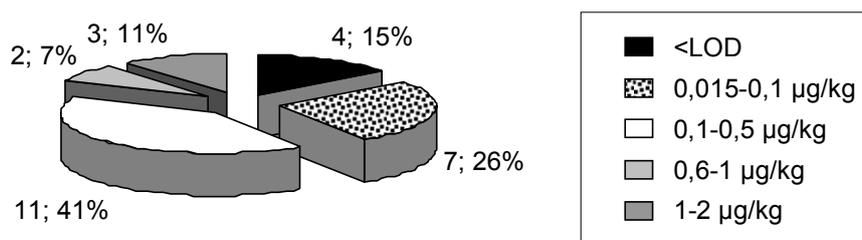
Figura 1. Distribuzione della contaminazione di AFB_1

Le prove di recupero condotte sulla matrice pesto hanno fornito valori compresi tra il 75% e l'85% per ciascuna Aflatossina.

Per n. 3 campioni i Limiti Massimi Tollerabili per l'AFB_1 e per le Aflatossine totali, calcolati sulla base della percentuale complessiva di frutta a guscio presente (anacardi e pinoli) sono stati superati; in tutti i tre casi l'apporto preponderante di contaminazione è stata ricondotta agli anacardi dichiarati presenti in percentuale rispettivamente del 10 e del 20% contro una percentuale di pinoli di valore inferiore ad 1.

In due dei tre casi di cui sopra, le partite di origine brasiliana, sono risultate accompagnate esclusivamente da documentazione analitica attestante l'assenza di Aflatossine rilasciate da laboratori del Paese di origine come è del resto stato frequentemente riscontrato durante il monitoraggio; un'analisi della validità di tali certificazioni non è stato l'oggetto del nostro controllo comunque si riterrebbe auspicabile un controllo dei lotti in entrata adottando le tecniche di campionamento previste dal Reg. CE 401/2006 e l'utilizzo di laboratori che operino secondo quanto previsto dal Reg. CE 882/2004; nel terzo caso presso l'azienda non è stata rilevata nessuna documentazione analitica a supporto della regolarità del lotto utilizzato.

A ulteriore supporto dell'ipotesi di una contaminazione prevalentemente legata agli anacardi si rileva, che nei 24 campioni positivi è possibile evidenziare la tendenza all'aumento della contaminazione da Aflatossine (in particolare B_1) nel prodotto finito in rapporto alla percentuale di anacardi impiegata nella ricetta (Tabella 1).

Tabella 1. Contaminazione in µg/kg di AFB_1 *vs* percentuale di anacardi presenti in ricetta

% anacardi in ricetta	Valore medio AFB_1 e intervallo di confidenza al 95%
3-9	0,12±0,04
10-14	0,29±0,17
15-20	0,66±0,55
30-35	0,81±0,45

Inoltre in tutti i 5 campioni di pesto non contenenti altra frutta secca oltre agli anacardi è stata rilevata contaminazione con un valore medio di AFB_1 pari a 0,68 ± 0,51 µg/kg.

Una migliore definizione del contributo ad una possibile contaminazione dei prodotti finiti apportata anche dall'altra frutta secca (nella maggior parte dei casi di origine cinese) potrà derivare dal prosieguo dei controlli e dal prelievo delle singole materie prime.

Sulla base della documentazione visionata in loco gli anacardi utilizzati dalle aziende presenti nella provincia di Imperia risultano di origine brasiliana o vietnamita ed entrano in Italia attraverso importatori con sede a Genova (solo in un caso è stata verificata l'importazione diretta dal Vietnam).

Le risultanze del monitoraggio sulla gestione del rischio Aflatossine hanno evidenziato generalmente (salvo in alcuni casi) una limitata conoscenza da parte delle aziende della problematica correlata al rischio di contaminazione del prodotto legata agli anacardi e all'altra frutta a secca/a guscio utilizzata e quindi un approccio non sistematico alla gestione del rischio stesso (in generale nella valutazione del rischio da parte delle aziende visitate il rischio chimico proveniente anche da altre fonti è comunque meno considerato rispetto a quello microbiologico).

Inoltre in più occasioni è stato evidenziato, sia presso le aziende sia sulla documentazione ad essi rilasciata dai laboratori di analisi esterni, che la mancata individuazione nel Reg. CE 1881/2006 di un limite specifico per i prodotti composti contenenti fra gli ingredienti la frutta secca o a guscio è stata erroneamente intesa come un'assenza di limite per i prodotti stessi senza considerare il rimando al limite tollerabile derivato previsto all'art.2.

Conclusioni

Il monitoraggio delle aziende conserviere a carattere prevalentemente artigianale e piccolo industriale della provincia di Imperia intrapreso in questi ultimi due anni dal nostro servizio, ha evidenziato come gli anacardi utilizzati nella preparazione di conserve alimentari tipo il pesto alla genovese e la salsa di noci, siano in grado di apportare al prodotto finito contaminazione dosabile da AFB_1 e totali anche se a livelli relativamente contenuti (inferiore ai valori di 2 µg/kg di AFB_1 e 4 µg/kg di Aflatossine totali indicati nell'allegato al Reg. CE 1881/2006 quali tenori massimi specifici per la frutta secca o a guscio pronti al consumo o utilizzati come ingredienti di prodotti alimentari); su tre dei 24 campioni positivi è stato verificato il superamento del limite massimo tollerabile calcolato, come previsto dall'articolo 2 del Reg. CE 1881/2006, sulla base

della percentuale complessiva d'ingredienti a rischio utilizzata nel prodotto.

Le aziende alimentari che utilizzano tale ingrediente devono adottare delle procedure permanenti basate sul sistema HACCP che tengano conto del rischio di contaminazione da Aflatossine, in particolare a livello della selezione dei fornitori e dei controlli analitici antecedenti all'introduzione in produzione, tenendo presente quanto previsto agli articoli 2 e 3 del Reg. CE 1881/2006.

Come autorità di controllo il nostro servizio è intervenuto sulle aziende che non risultavano aver predisposto le procedure di cui sopra chiedendo i correttivi necessari e le azioni preventive il più possibile commisurate all'entità delle aziende stesse.

Auspichiamo che la maggiore attenzione alle caratteristiche di sicurezza delle materie prime relativamente al rischio di contaminazione da Aflatossine da noi imposta alle aziende conserviere locali determini l'instaurarsi di un meccanismo virtuoso che, partendo dalla selezione dei fornitori operata a livello di aziende utilizzatrici, si riverberi positivamente anche a livello dell'importazione.

Bibliografia

1. Freire FCO, Kozakiewicz Z, Russell R, Paterson M. Mycoflora and mycotoxins of Brazilian cashew kernels. *Mycopathologia* 1999;45:95-103.
2. Leszczynska J, Kucharska U, Zegota H. Aflatoxins in nuts assayed by immunological methods. *European Food Research and Technology* 2000;210:213-5.
3. Unione Europea. Regolamento (CE) n.1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *GUCE* L 364, 20 dicembre 2006.
4. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *The EFSA Journal* 2007;446:1-127.
5. Statement of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on the effects on public health of an increase of the levels for aflatoxin total from 4 µg/kg to 10 µg/kg for tree nuts other than almonds, hazelnuts and pistachios. *The EFSA Journal* 2009; 1168, 1-11.
6. Unione Europea. Decisione della Commissione 2006/504/CE del 12 luglio 2006 che stabilisce condizioni particolari per l'importazione di determinati prodotti alimentari da alcuni paesi terzi a causa del rischio di contaminazione da Aflatossine di tali prodotti. *GUCE* L 199, 21 luglio 2006.

Ringraziamenti

Si ringraziano, per la ASL 1 Imperiese, la Dott.ssa Maria Lina Montaldi e i tecnici della prevenzione Roberta Arnaldi, Corrado Bonato, Uliano Bottino e Marco Ferretti, e per il Dipartimento Provinciale dell'ARPAL di Genova i tecnici di laboratorio Silvia Anselmo e Lucia Angella.

STUDIO DI UN SISTEMA DI DECONTAMINAZIONE DELL'OCRATOSSINA A DAI PRODOTTI DI SALUMERIA

Tiziana Pinciroli, Luca Maria Chiesa, Carlo Cantoni, Pier Antonio Biondi
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Milano

Introduzione

Le Ocratossine sono un importante gruppo di micotossine tra cui la più rilevante è l'Ocratossina A (OTA). L'OTA è il prodotto del metabolismo secondario di miceti dei generi *Aspergillus* e *Penicillium* e ha effetti epatotossici, nefrotossici, teratogenetici ed è un possibile cancerogeno per l'uomo (IARC gruppo 2B) (1). Muffe produttrici di OTA sono in grado di svilupparsi su molti alimenti, soprattutto in fase di conservazione e stagionatura (cereali, frutta secca, caffè, cacao, spezie, liquirizia, vino, birra) e sulla superficie dei salumi.

In Italia, per quanto riguarda i prodotti carnei, la circolare del Ministero della Sanità n. 10 del 9 giugno 1999 ha fissato il limite massimo di 1 µg/kg di OTA nella carne suina e prodotti derivati (2).

Lo scopo del nostro lavoro è stato monitorare il livello di contaminazione da Ocratossina A in salami del Nord Italia e studiare l'efficacia della spazzolatura meccanica dei budelli come sistema di decontaminazione.

Materiali e metodi

Nella fase iniziale di screening sono stati analizzati 21 salami pronti per la vendita provenienti da aziende del Nord Italia per monitorare il livello di contaminazione da OTA. Al fine di studiare l'efficacia della spazzolatura sono state poi considerate 6 coppie di campioni pronti per la vendita ciascuna proveniente da un medesimo lotto, con il medesimo tempo di stagionatura (compreso tra 40 e 140 giorni) e condizioni di stagionatura. Di ciascuna coppia, un campione è stato spazzolato, mentre l'altro non è stato sottoposto ad alcun trattamento di decontaminazione. La possibile contaminazione a *spot* del budello ne ha reso necessaria la completa asportazione per l'analisi.

È stato rilevato e quantificato il livello di OTA nel budello, e di alcuni campioni è stata analizzata anche la parte edibile a cuore del prodotto.

Il procedimento analitico ha seguito la metodica descritta da Chiavaro *et al*. (3).

I campioni, di budello e parte edibile prelevata a cuore, sono stati estratti con una soluzione di metanolo e bicarbonato di sodio 1% (70:30); sono stati in seguito sottoposti a purificazione su colonna di immunoaffinità (Ochratest, VICAM) secondo le condizioni suggerite dalla casa produttrice. La quantificazione di OTA è stata eseguita tramite *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) con rivelazione fluorimetrica e standardizzazione esterna. L'analisi è stata condotta utilizzando una colonna Waters Xterra® MS C18 (150 mm x 4,6, 5 µm) usando come fase mobile una miscela di 3 eluenti: A=CH_3OH:H_2O (1:1), B= CH_3OH e C= CH_3COOH1%: CH_3OH (9:1); la composizione della miscela è stata fatta variare in 2 minuti da 40:20:40 a 0:60:40.

Risultati e discussione

Per quanto riguarda l'analisi in HPLC la curva di taratura è risultata lineare nell'intervallo 0,16-20 ng/mL e il limite di rivelazione (*Limit of Detection*, LOD) è risultato di 0,08 ng/mL.

Nella Figura 1 viene riportata l'immagine di un salame visibilmente contaminato da *A.ochraceus.*

Figura 1. Salame visibilmente contaminato da *A. ochraceus*

Nella Figura 2 è riportato il cromatogramma di un campione contaminato da OTA.
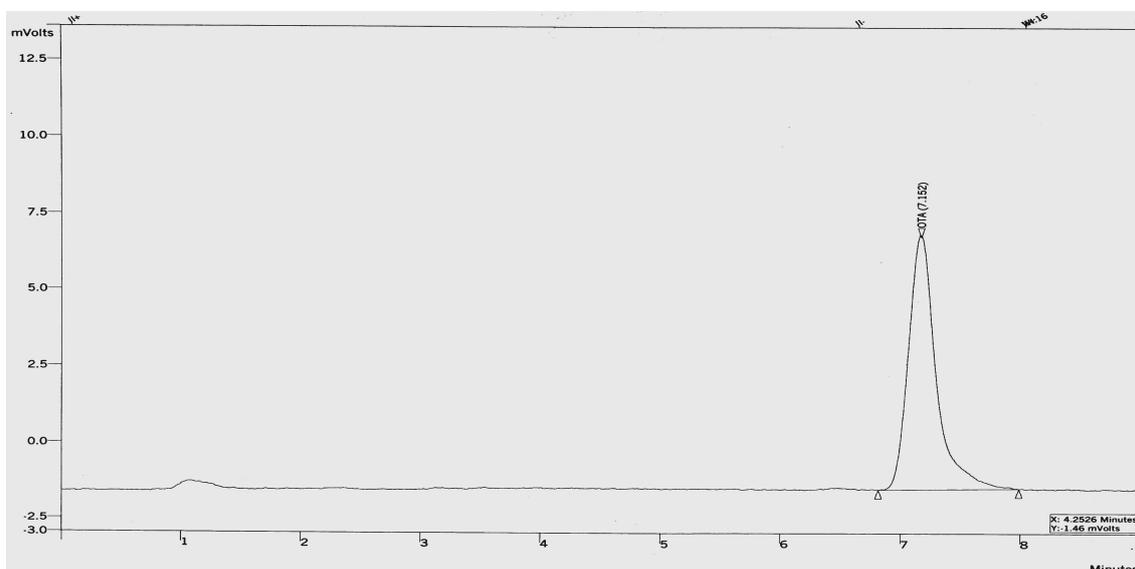
Figura 2. Cromatogramma di un campione contaminato da OTA

Nella Figura 3 sono riportati i contenuti di OTA rilevati in tutti i campioni non spazzolati.
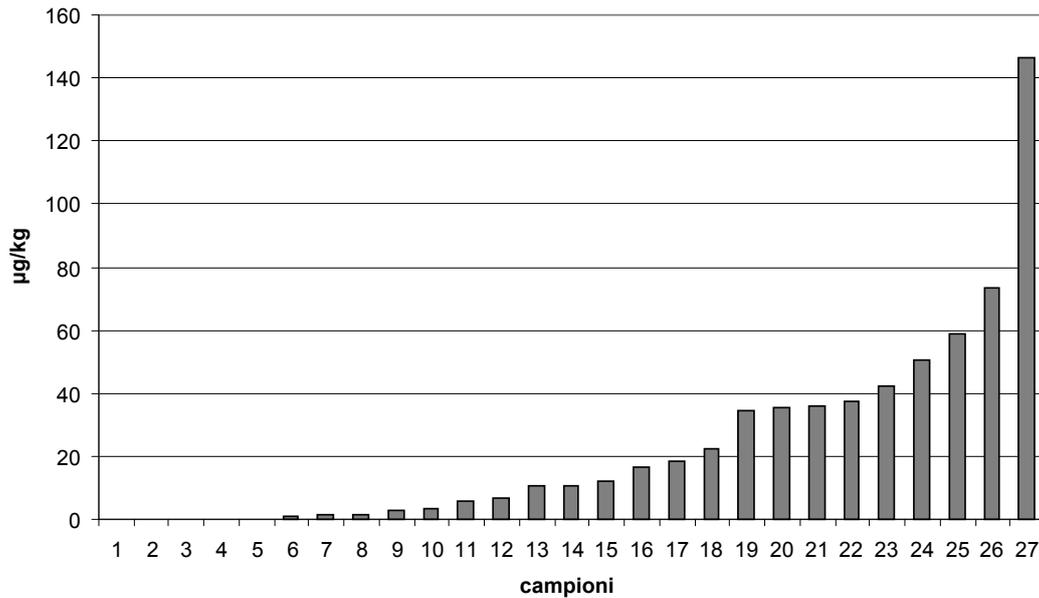
Figura 3. Concentrazione di OTA nei campioni pronti alla vendita non sottoposti a spazzolatura

Dalle analisi è emerso che dei 27 campioni non spazzolati, il 67% ha un livello di OTA <30 µg/kg, il 26% ha un livello compreso tra 30 e 60 µg/kg e il 7% ha un livello tra 60 e 150 µg/kg (Figura 4). Dei campioni con OTA <30 µg/kg, il 27% non presentava contaminazione >LOD.
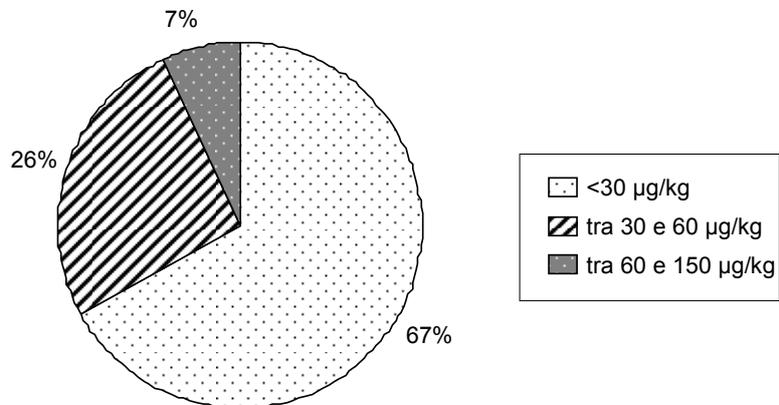
Figura 4. Percentuale di contaminazione da OTA nei campioni non sottoposti a spazzolatura

Non è stata riscontrata correlazione tra contenuto di OTA e tempo di stagionatura. Le analisi a cuore del prodotto non hanno mai mostrato un contenuto di OTA superiore al valore di LOD; questo conferma che l'OTA presente sulla superficie del budello non è stata in grado di penetrare all'interno del prodotto. Per i campioni analizzati viene dunque rispettato il limite della circolare ministeriale di 1 µg/kg.

È stato possibile verificare (Figura 5) che il contenuto di OTA nel budello viene ridotto tramite la spazzolatura, in media per il 60%, da un minimo di 30% ad un massimo di 93%.
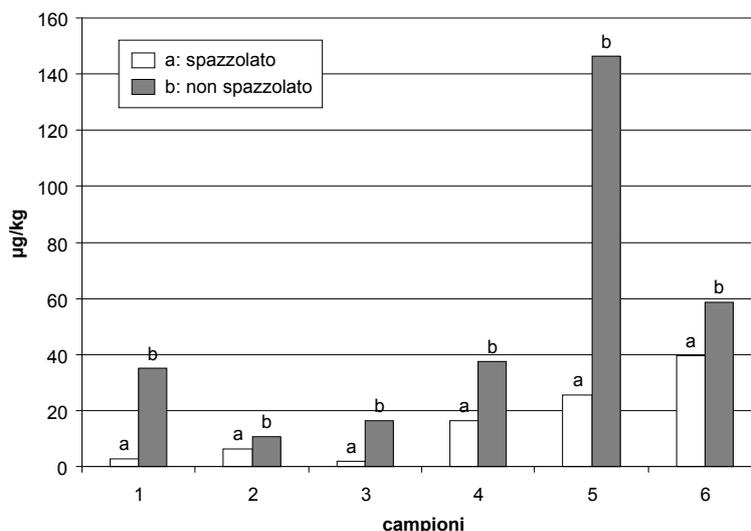
Figura 5. Concentrazione di Ota nei budelli spazzolati e non spazzolati

La variabilità del risultato dipende da diversi fattori:

- forma del salame: i salami sottoposti a spazzolatura avevano dimensioni e forme diverse, e la presenza di scanalature profonde può rendere più difficile la rimozione fisica dell'OTA da parte della delle spazzole.
- livello di contaminazione di partenza.
- manutenzione e pulizia delle spazzole.

Conclusioni

La spazzolatura a secco studiata in questa indagine del tutto preliminare ha fornito, per i motivi di cui sopra, risultati discontinui e meno efficaci della spazzolatura che utilizza anche un sistema di lavaggio ad acqua e aspirazione, oggetto di precedenti studi. Essa rappresenta comunque un economico metodo di decontaminazione da OTA, ma soltanto un accurato screening iniziale della contaminazione nei prodotti dell'azienda e la verifica dell'efficacia della spazzolatura nonché la pianificazione di cicli di lavaggio della macchina spazzolatrice possono garantire un elevato grado di abbattimento dell'OTA, laddove non si possa prevenire agendo sulle condizioni di umidità e temperatura nella fase di stagionatura.

Bibliografia

1. Ochratoxin A. In: *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 56 Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterociclyc aromatic amines and mycotoxin.* Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1993. p. 489-521.
2. Italia. Circolare del Ministero della Sanità 9 giugno 1999, n.10. Direttive in materia di controllo ufficiale sui prodotti alimentari: valori massimi ammissibili di micotossine nelle derrate alimentari di

3. Chiavaro E, Lepiani A, Colla F, Bettoni P, Pari E, Spotti E. Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and a quick fluorometric method. *Food additives and contaminants* 2002;19(6):575-81.

Ringraziamenti

Questo lavoro, condotto all'interno del progetto dal titolo "Innovazione per il Miglioramento dei Processi nell'Agroalimentare: Trasferimento Tecnologico e Organizzativo"**,** è stato finanziato da Regione Lombardia e Unione Camere nell'ambito della convenzione artigianato. Si ringrazia il Dr. Merlo Alessandro-Agrimercati.
Si ringraziano inoltre la Fondazione Banca del Monte di Lombardia, nella persona del Presidente il dott. Aldo Poli, e la ditta "Safe Food" nelle persona del dott. Matteo Luppi.

1999-2009: AFLATOSSINA M_1 NEL LATTE, UN PROBLEMA RISOLTO?

Luca Sillari, Enzo Casarini, Alberto Zaniboni, Kalinka Grozeva
Newlat SpA, Stabilimento Giglio di Reggio Emilia

Cronologia dell'analisi dell'Aflatossina M_1 nel latte

Nel 1999 Newlat iniziò ad elaborare un piano aziendale di gestione del rischio Aflatossine, mediante analisi di ruotine sul latte in entrata e intervento diretto sugli allevatori il cui prodotto non fosse conforme.

In occasione del 1° Congresso Nazionale sulle micotossine tenutosi a Roma presso l'Istituto Superiore di Sanità nel 2004, Newlat presentò un lavoro dal titolo "Aflatossina M_1 nel latte, un problema risolvibile" in cui si illustrava questo piano di controllo, e l'ottimo risultato che diede durante l'episodio di grave contaminazione verificatosi durante la stagione 2003-2004.

Oggi dopo 10 anni di monitoraggio delle micotossine nel latte, è possibile fare un bilancio dell'attività svolta, capire come sia cambiato l'approccio degli operatori della filiera nei confronti del problema e in quale misura la contaminazione interessi ancora il prodotto.

All'inizio, infatti, la questione è stata affrontata in maniera piuttosto disomogenea (nonostante il rispetto del vincolo di legge), ma dopo la crisi del 2003-2004 c'è stata una notevole evoluzione in fatto di attenzione e sensibilità al problema, che ha favorito un grande sviluppo tecnico e gestionale che ha influito positivamente sulla qualità del prodotto finito.

Leggendo, ad esempio, i dati raccolti e valutando la percentuale sul totale di campioni con valori superiori a 40 ng/kg (soglia di attenzione in quanto il limite di legge è 50 ng/kg), si nota che si è partiti nel 1999 con una percentuale di circa il 10%, fino ad arrivare nel biennio 2007-2008 a valori prossimi all'1%, i più bassi fino ad ora.

Alla luce di questi dati si può dire che 10 anni di lavoro hanno permesso a Newlat non solo di controllare il fenomeno della contaminazione dell'Aflatossina M1 (AFM_1) nel latte, ma di incrementarne notevolmente la qualità fornendo un prodotto altamente sicuro, e a far sì che tale problema sia passato dall'essere un'emergenza ad essere una fenomeno sotto controllo.

Tecniche d'analisi e gestione del rischio

Le prime analisi dell' AFM_1 nel latte erano difficili e costose e si facevano essenzialmente in *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) mediante l'utilizzo di colonnine ad immunoaffinità, poiché altri metodi cosiddetti rapidi o di screening erano poco diffusi o non pienamente affidabili.

L'analisi in HPLC era quella in grado di fornire i risultati più attendibili; richiedeva però una strumentazione costosa, tecnici adeguatamente preparati e tempi lunghi di realizzazione: per ogni campione erano necessari infatti circa 90 minuti prima di avere il risultato.

A questo periodo risale la decisione di Newlat di porre un limite interno sul contenuto di AFM_1 nel latte crudo in arrivo, 20 ng/kg contro i 50 ng/kg previsti dalla legge, fornendo per

contro agli allevatori la possibilità di far analizzare i propri mangimi relativamente al contenuto di Aflatossina B_1 (AFB_1) che è fonte della contaminazione del latte.

Tale restrizione ha dapprima creato problemi con gli allevatori, percepita come un aggravio dei costi di produzione, ma una volta spiegata la situazione e l'importanza di tale strategia, si è instaurato un rapporto di fiducia e collaborazione. Porre questa soglia limite, ha significato, infatti, due risultati immediati: poter prevenire l'insorgere di contaminazioni gravi avendo sempre un margine d'intervento nel rispetto del limite di legge, poter stabilire con certezza quale alimento presente in stalla fosse contaminato con AFB_1 e quindi non idoneo all'alimentazione delle vacche. La riprova che tale strategia era vincente si è avuta durante l'autunno del 2003, quando in seguito ad un'annata particolare il mais per uso zootecnico si è rivelato particolarmente contaminato, mettendo in allarme tutto il settore; crisi che è stato possibile gestire avendo già una buona conoscenza del problema.

Questo periodo cruciale ha fatto da spartiacque per il controllo delle micotossine nel latte, dando il via ad un grande impegno da parte di tutti gli operatori della filiera, e soprattutto dei produttori di mangimi, che hanno fatto da volano per il netto miglioramento che si è avuto negli anni successivi. A titolo d'esempio, sempre citando l'esperienza di Newlat, si può dire che a differenza di alcuni anni addietro attualmente gli episodi più significativi di contaminazione da AFB_1 nel mais, si riscontrano prevalentemente in partite prodotte in proprio dagli allevatori e non più su mangimi acquistati sul mercato.

Anche dal punto di vista analitico ci sono stai dei grossi passi avanti: per quanto riguarda l'HPLC si è passati da un tempo di analisi di 90 minuti per campione agli attuali 40 minuti per campione, e si stanno affermando sul mercato dei metodi di screening rapido realmente affidabili.

Visto il miglioramento netto e l'affidabilità a cui sono arrivati alcuni di questi metodi d'indagine veloce, anche Newlat ha adottato un sistema di questo tipo (da affiancare all'HPLC che serve come conferma di positività e taratura), avendo così la possibilità di implementare il monitoraggio sulle cisterne in arrivo, aumentando la possibilità di prevenire l'innalzarsi del contenuto di micotossine nel latte.

La prevenzione infatti è fondamentale, poiché alimentando le bovine con mangime contaminato da AFB_1, si ha un picco di AFM_1 nel latte già dopo 24 ore che può impiegare fino a 72 ore per tornare al livelli accettabili.

Analisi dei dati in autocontrollo

Newlat ha sempre adottato una politica molto restrittiva per quanto riguarda il controllo dell'AFM_1 nel latte, imponendo ai suoi fornitori un limite massimo di 20 ng/kg di concentrazione contro i 50 ng/kg previsti per legge. Il superamento di tale limite porta all'attivazione di una procedura di controllo dei lotti di mangime presenti in stalla con individuazione e sostituzione di quello a rischio. Questa manovra ha permesso di avere sempre livelli di contaminazione molto bassi, un ampio margine di intervento sul rispetto del limite legale, ma soprattutto una notevole possibilità di prevenzione riuscendo a bloccare in tempo l'incremento di AFM_1 nel latte in seguito all'assunzione di mangime contaminato.

Per capire meglio la reale portata del lavoro svolto in questi anni, si riporta una statistica relativa ai dati raccolti in autocontrollo sul latte crudo in arrivo presso lo stabilimento Giglio di Reggio Emilia (Tabella 1). I dati di relativi alla concentrazione di AFM_1 nel latte crudo di raccolta, suddivisi per anno, sono organizzati in classi di valori di concentrazione che idealmente corrispondono ad un rischio crescente.

Tabella 1. Percentuali di campioni di latte crudo (in arrivo presso lo stabilimento Giglio di Reggio Emilia) per classi di concentrazione di AFM_1 per anno

Annate	A (<10 ng/kg)	B (<20 ng/kg)	C (<30 ng/kg)	D (<40 ng/kg)	E (>40 ng/kg)
1999	19,50	45,10	17,00	8,80	9,60
2000	29,40	40,25	14,55	6,20	9,60
2001	25,80	40,15	21,42	7,40	5,23
2002	40,20	38,00	13,30	4,90	3,60
2003	26,32	26,32	19,21	11,15	7,00
2004	20,11	24,13	25,11	15,25	15,40
2005	38,86	41,29	13,90	4,30	2,40
2006	5,50	45,80	33,19	8,75	6,76
2007	10,71	63,46	21,86	3,10	0,87
2008	29,27	54,14	13,50	1,80	1,29

La suddivisione in classi avviene secondo la percentuale sul numero totale di campioni e va da valori A<10 ng/kg (rischio minimo), B<20 ng/kg (il limite adottato come standard interno), C<30 ng/kg, D<40 ng/kg, E>40 ng/kg (rischio massimo). Le classi più significative sono: A<10 ng/kg, B<20 ng/kg, ed E>40 ng/kg (*vedi* Tabella 1). Anche per la classe di concentrazione B<20 ng/kg (lo standard interno) i valori hanno subito un incremento dal 45% del 1999 al 54% del 2008. Questo trend decisamente positivo si è mantenuto costante nonostante alcune annate particolari come ad esempio il 2003 e 2004. Risulta evidente come la gestione integrata del rischio Aflatossina nel latte ne abbia notevolmente ridotto il contenuto, considerando che in Italia, probabilmente per ragioni climatiche, la contaminazione è da considerarsi fisiologica.

La Figura 1 mostra l'andamento sopra descritto, ed evidenzia quanto la stagione 2003-2004 abbia costituito un evento eccezionale e di come però si sia riusciti a fare tesoro di quest'esperienza negativa per arrivare ad ulteriori margini di miglioramento.
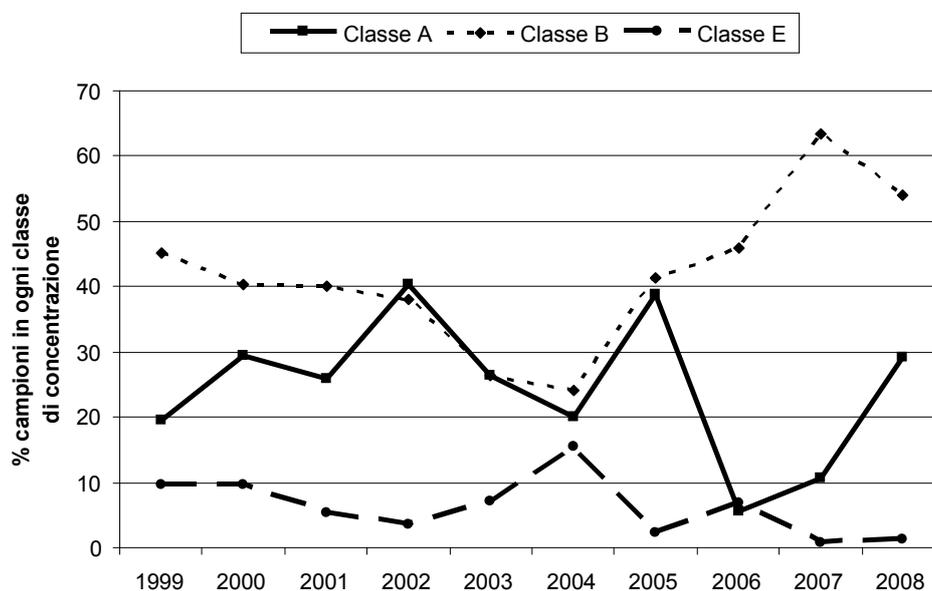
Figura 1. Andamento annuale del rischio di AFM_1 nel latte crudo in arrivo presso lo stabilimento Giglio di Reggio Emilia, secondo la suddivisione in classi di concentrazione

Conclusioni

A conclusione di questa breve indagine storico-tecnologica si può dire che il lavoro svolto da Newlat in 10 anni di gestione del rischio micotossine nel latte, ha portato a dei risultati reali che si possono così riassumere: abbassamento e stabilizzazione dei livelli di AFM_1 nel latte, creazione di un controllo di filiera coinvolgendo anche gli allevatori e sensibilizzando i produttori di mangimi.

Un'attività molto intensa e onerosa che ha permesso di incrementare la qualità del prodotto fornito al consumatore, contribuendo a rendere migliore un alimento fondamentale dal punto di vista nutrizionale ed economico.

L'adozione e il consolidamento di tali buone tecniche produttive sembra essere sufficiente a garantire la massima qualità del prodotto, anche in situazione impreviste ed eccezionali che dovessero verificarsi, e si può quindi dire che il rischio AFM_1 nel latte sembra oggi realmente sotto controllo.

Bibliografia

1. Albertini A, Casarini E, Menguzzato G, Sillari L, Zaniboni A. Il controllo delle Aflatossine nel latte Alimentare: un'esperienza di monitoraggio aziendale. *Igiene alimenti* 2002;3.
2. Sillari L, Casarini E, Zaniboni A, Grozeva K. Aflatossina M1 nel latte: un problema risolvibile. In: Miraglia M, Brera C (Ed.). *1° Congresso Nazionale: Le micotossine nella filiera agro alimentare. Roma, Istituto Superiore di Sanità, 29-30 novembre 2004. Atti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporti ISTISAN 05/42). p. 165-71.
3. Sillari L, Casarini E, Zaniboni A, Grozeva K. Rapporto Aflatossina M1/M2 come indicatore di efficienza dell'analisi HPLC In: Miraglia M, Brera C (Ed.). *2° congresso nazionale: Le micotossine nella filiera agro alimentare. Roma, Istituto Superiore di Sanità 16-18 ottobre 2006. Atti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/37). p. 243-8.

TERZA SESSIONE
Diagnostica delle micotossine

ANALISI DI FUMONISINE B_1 E B_2 IN FARINE DI MAIS MEDIANTE TECNICA HPLC-MS/MS E VALUTAZIONE DELLA LORO TOSSICITÀ SU *VIBRIO FISCHERI*

Barbara Romagnoli (a), Maria Ferrari (a), Cecilia Bergamini (a), Paola Silingardi (b), Elena Morandi (b), Annamaria Colacci (b)
(a) Riferimento Analitico Regionale Alimenti, OGM e Biosicurezza, Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente dell'Emilia Romagna, Sezione Provinciale di Bologna, Bologna
(b) Centro Tematico Regionale Cancerogenesi Ambientale, Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente dell'Emilia Romagna, Sezione Provinciale di Bologna, Bologna

Introduzione

Il progetto MITICA (Microarray e Proteomica: Tecnologie per l'Identificazione di Contaminanti negli Alimenti) si focalizza sullo sviluppo di strumenti diagnostici innovativi per la rapida identificazione di classi di contaminanti chimici in matrici alimentari e si avvale del contributo scientifico di 5 unità operative, tra cui il Centro Tematico Regionale (CTR) Cancerogenesi Ambientale, che coordina il progetto, e il Riferimento Analitico Regionale (RAR) Alimenti, Organismi Geneticamente Modificati e Biosicurezza dell'Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente dell'Emilia Romagna. Nell'ambito dell'attività scientifica è stata studiata la contaminazione da Fumonisine B1 e B2 (FB_1 e FB_2) nella matrice mais, valutando sia la loro presenza nelle farine mediante cromatografia liquida accoppiata con spettrometria di massa (*High Performance Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry*, HPLC-MS/MS) sia il loro effetto tossico su *Vibrio Fischeri*.

Sono stati analizzati 70 campioni di farine di mais, di cui il 90% è risultato contaminato, anche a livelli superiori a 2000 µg/kg. Le Fumonisine sono state estratte dalla farina di mais con un miscela di acetonitrile, metanolo e H_2O, il filtrato, diluito con *Phosphate Buffered Saline* (PBS), è stato purificato su colonnine di immunoaffintà Fumoniprep® e l'eluato analizzato in HPLC-MS/MS mediante tecnica *elettrospray* in ionizzazione positiva (ESI^+). Gli ioni frammento scelti per FB_1 e FB_2, sono stati rispettivamente m/z 334 e 336 per la quantificazione e m/z 352 e 318 per la conferma. Il range di linearità è compreso tra 35-500 ng/mL sia per FB_1 che per FB_2 con un coefficiente di correlazione (r^2) di 0,999 e il limite di rivelazione è di 20 µg/kg. La percentuale di recupero è 90% per entrambe le tossine.

Il metodo analitico viene periodicamente controllato mediante la partecipazione al FAPAS® *Proficiency Test* dal 2007.

La tossicità di FB_1 e FB_2 è stata valutata utilizzando il *Microtox toxicity test system* su *V. fischeri* (ceppo NRRL B11177). Il trattamento simultaneo dei batteri luminescenti con FB_1 e FB_2 ha indotto un effetto sinergico significativo rispetto alla tossicità di ogni singola molecola. Abbiamo inoltre sviluppato una *slide* per lo studio dell'espressione genica di *Vibrio fischeri*, proprietaria, e stiamo attualmente caratterizzando la risposta sinergica osservata a livello trascrizionale.

Determinazione di FB_1 e FB_2 in HPLC-MS/MS in farine di mais

Materiali e metodi

Materiali

La soluzione standard di una miscela di FB_1 e FB_2 in acetonitrile/acqua ultrapura (50/50 v/v) alla concentrazione di 50 µg/mL ciascuna, è stata acquistata da Biopure (Tallin, Austria) e conservata a -20°C. L'acqua ultrapura utilizzata è prodotta da un impianto Milli-Q (Micropore Corporation, Billerica, MA, USA). Tutti i reagenti sono forniti da Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia): l'acetonitrile e il metanolo sono di grado HPLC, il fosfato bibasico di sodio, il fosfato monobasico di potassio e il cloruro di sodio, utilizzati per la preparazione del tampone fosfato (*Phosphate Buffer Solution*, BPS), sono di grado tecnico, così come l'acido formico, utilizzato come additivo per la soluzione eluente. Le colonnine di immunoaffinità Fumoniprep sono della ditta Rhone Diagnostic Technologies (Glasgow, Scozia).

I campioni estratti sono filtrati con filtri di carta (Carlo Erba Reagenti) e di fibra di vetro (Munktell, Bärenstein, Germany).

Preparazione del campione

25 g di campione di mais sono estratti con 2,5 g di sodio cloruro e 100 mL di acetonitrile/metanolo/H_2O (25/25/50 v/v/v) e messi ad agitare per 30 minuti su agitatore orizzontale. Dopo filtrazione su carta, 10 mL dell'estratto sono diluiti con 40 mL di PBS e filtrati nuovamente su fibra di vetro. 10 mL della soluzione così ottenuta sono applicati alla colonnina di immunoaffinità che contiene anticorpi specifici per le FB_1 e FB_2 (1). La colonnina è lavata con 10 mL di PBS e le tossine eluite con 2 mL di metanolo in un pallone da 50 mL. L'estratto ottenuto viene portato a secchezza sotto vuoto mediante evaporatore rotante con bagnomaria alla temperatura di 35°C. Il contenuto del pallone viene disciolto in 1 mL di acetonitrile/H_2O Milli-Q (1/1 v/v) e iniettato all'HPLC-MS/MS.

Analisi in HPLC-MS/MS

Lo strumento utilizzato per l'identificazione e la quantificazione delle Fumonisine è l'HPLC Alliance® 2695 (Waters, Milliford, MA, USA) e lo spettrometro di massa Tandem Quattro MicroTM API (Waters, Milliford, MA, USA) con ionizzazione *elettrospray* (ESI) in modalità positiva. I parametri di massa sono stati ricercati tramite infusione diretta di uno standard di una miscela di FB_1 e FB_2 alla concentrazione di 2,5 µg/mL ciascuna e a un flusso di 10 µL/min. Le condizioni di lavoro ottimali trovate sono: voltaggio del capillare, 4,50 kV, voltaggio del cono, 45,00 kV, temperatura della sorgente ESI, 80°C, temperatura di desolvatazione, 160°C, flusso del gas di desolvatazione, 250 L/h (il gas è azoto ed è prodotto dal generatore High Purity Nitrogen Generetor, Peak Scientific, Scozia).

L'ottimizzazione dei parametri del metodo HPLC-MS/MS si è ottenuta con una scansione in modalità MS-*scan* in un range di valori di massa su carica (m/z) di 600-800, che ha evidenziato la presenza dello ione [M-H]+ m/z 722,4 per l'FB_1 e lo ione [M-H]+ m/z 706,4 per l'FB_2. Si è quindi eseguita una scansione in MS/MS per determinare gli ioni frammento per entrambe le tossine. Per l'FB_1 il frammento m/z 334,6, risultato il più abbondante, è stato utilizzato per la quantificazione e il 352,4 per la conferma; per l'FB_2 il 336,7 è stato individuato per la quantificazione e il 318,6 per la conferma. La Tabella 1 riassume i parametri di *tuning* dello ione precursore e dei frammenti selezionati per entrambe le Fumonisine.

Tabella 1. FB_1 e FB_2: parametri di *tuning* dello ione precursore e dei frammenti selezionati

Analiti	Tr	Voltaggio cono (V)	Transizione di quantificazione	Energia di collisione (eV)	Transizione di conferma	Energia di collisione (eV)
FB_1	16,6	45,0	722,4 > 334,6	40,00	722,4 > 352,4	40,00
FB_2	17,6	45,0	706,4 > 336,7	40,00	706,4 > 318,6	40,00

La separazione avviene con una colonna Discovery C18 (15 cm x 2,1 mm, 5 µm) Supelco (Milano, Italia) alla temperatura di 30°C. L'eluizione è condotta in gradiente con due fasi mobili: H_2O Milli-Q + 0,1% acido formico e acetonitrile + 0,1% acido formico, come indicato in Tabella 2. Il flusso di lavoro è di 0,2 mL/min e il volume di iniezione è 10 µL. Il tempo di analisi è 30 minuti. Per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati si è utilizzato il software MassLynx 4.0 (Waters, Milliford, MA, USA).

Tabella 2. Gradiente di eluizione: il solvente A è H_2O Milli-Q + 0,1% acido formico e il solvente B è acetonitrile + 0,1% acido formico

Tempo (min)	Solvente A %	Solvente B %
0,0	100,0	0,0
2,0	100,0	0,0
11,0	5,0	95,0
21,0	5,0	95,0
22,0	100,0	0,0
30,0	100,0	0,0

Risultati e discussione

La validazione del metodo si è ottenuta attraverso l'elaborazione statistica indicata dalle "Linee guida per la validazione dei metodi analitici e per il calcolo dell'incertezza di misura" di ARPA Emilia Romagna (2). I parametri di validazione sono: limite di rivelazione (*Limit of Detection,* LOD), limite di quantificazione (*Limit of Quantification*, LOQ), precisione, recupero e ripetibilità strumentale.

Curve di taratura e calcolo LOD e LOQ

Le curve di taratura si sono ottenute partendo dalla soluzione di lavoro della miscela di FB_1 e FB_2 alla concentrazione di 2,5 µg/mL ciascuna, usata anche per il *tuning*. Si sono ottenuti sei livelli di taratura con un range di linearità di 35-500 ng/mL e un coefficiente di correlazione (r^2) di 0,999 per entrambe le tossine.

Il LOD è di 20 µg/kg e il LOQ è di 60 µg/kg sia per FB_1 che per FB_2.

Prove di recupero

Si è valutata l'efficienza del metodo di estrazione effettuando otto prove di recupero su farine di mais ad un livello di contaminazione delle Fumonisine totali (FB_1 + FB_2) pari a 1000 µg/kg, valore corrispondente al limite di contaminazione massimo, indicato dal Regolamento Comunitario (3), per il granoturco e prodotti derivati destinati al consumo umano diretto. Il valore medio trovato è 90% sia per FB_1 che per FB_2. Tali valori sono stati confermati replicando sei volte la matrice certificata di mais (BRM 003003 - Biopure - Tallin, Austria) contaminata con FB_1= (2406 ± 630) µg/kg e FB_2 = (630 ± 116) µg/kg e ottenendo il fattore di recupero pari a

90% per entrambe le tossine. I valori di recupero risultanti sia per le prove di contaminazione di matrici bianche che per le prove sulla matrice certificata, soddisfano i requisiti richiesti dal Reg. CE 401/2006 (4). Ulteriori conferme della validità del metodo sono state ottenute mediante la partecipazione annuale ai *ring test* del FAPAS (*The Food and Environment Research Agency*) *Proficiency tests*. La Figura 1 mostra i cromatogrammi delle due transizioni di entrambe le Fumonisine ottenuti dall'analisi del *ring test*, mais, del FAPAS (T2255) contaminato da 389 µg/kg di FB_1 e da 228 µg/kg di FB_2.
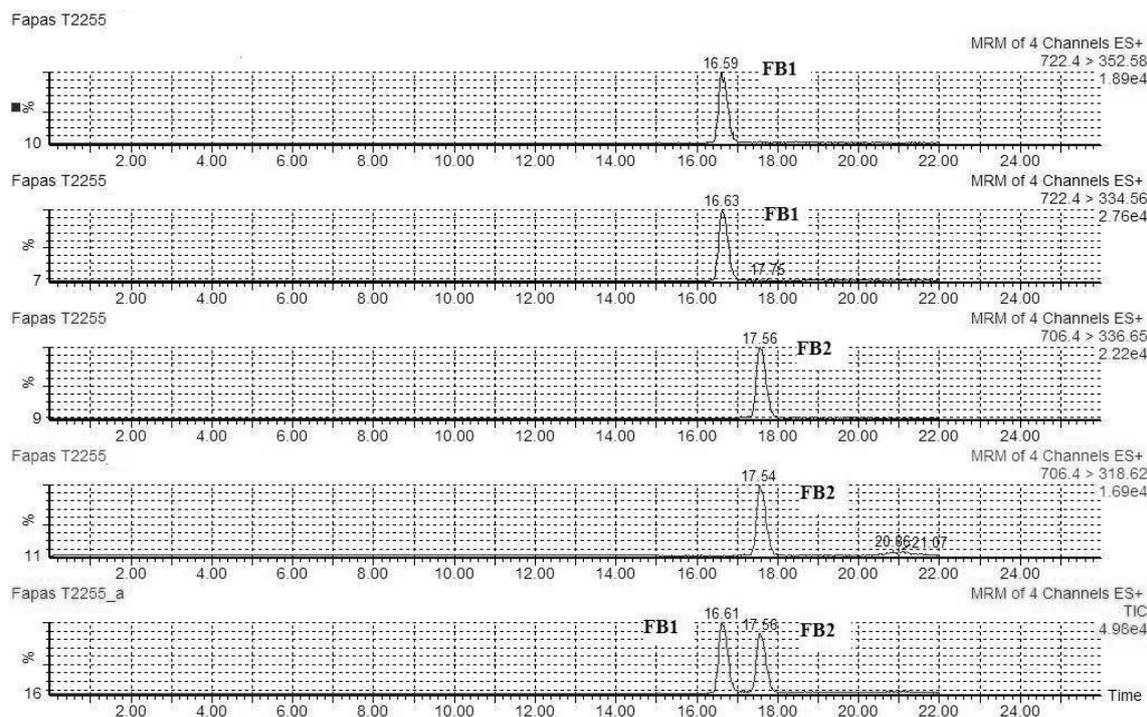
Figura 1. Cromatogrammi delle due transizioni delle Fumonisine del *ring test* del FAPAS (T2255) FB_1 = 389 µg/kg, FB_2 = 228 µg/kg

Valutazione della ripetibilità del sistema HPLC-MS/MS

Mediante 10 iniezioni successive di una miscela dei due standard FB_1 e FB_2, si è valutata la performance dello strumento calcolando la deviazione standard percentuale dei tempi di ritenzione e dei picchi, come indicato in Tabella 3.

Tabella 3. Deviazione Standard (DS) percentuale dei tempi di ritenzione (Tr) e delle aree dei picchi cromatografici, ottenuti iniettando 10 volte uno standard di FB_1 e FB_2 per la valutazione della ripetibilità

Analita	DS % Tr	DS % Area
FB_1	9,8	0,08
FB_2	9,3	0,11

I valori ottenuti confermano il buon funzionamento della strumentazione in uso e l'adeguata scelta effettuata delle condizioni di ionizzazione delle tossine che garantisce una buona ripetibilità nella formazione dello ione molecolare nella sorgente.

Ricerca di Fumonisine in campioni di farine di mais

Il metodo studiato è stato applicato all'analisi di 70 campioni di farine di mais prelevati, nel biennio 2007-2009, dalle Azienda Unità Sanitaria Locale (AUSL) della Regione Emilia Romagna secondo la procedura del Reg. CE 401/2006 (4). Il 90% delle farine è risultato contaminato da Fumonisine totali anche ad alti livelli: l'10% con valori compresi tra 1000 e 2000 µg/kg e il 9% con valori superiori a 2000 µg/kg, con un massimo di 5900 µg/kg (Figura 2). I campioni di farine di mais analizzati sono stati messi a disposizione dell'Unità Operativa 1 per le prove tossicologiche in *V. fischeri*.
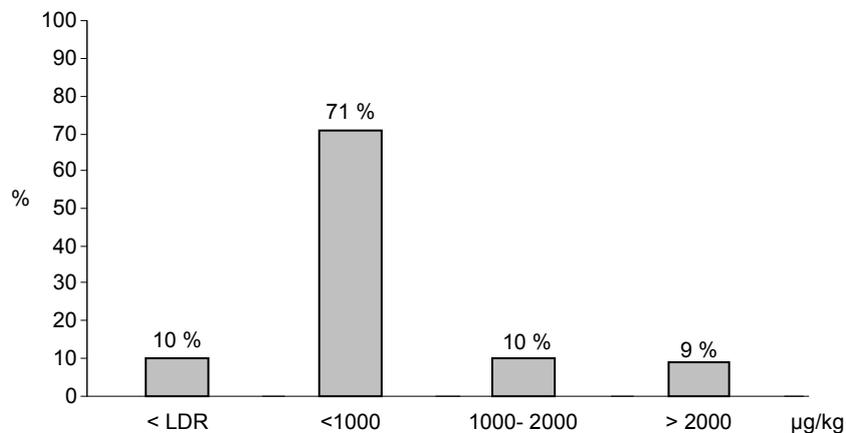
Figura 2. Percentuale di contaminazione di 70 campioni di farine di mais analizzati tra il 2007 e il 2009

Conclusioni

Il metodo HPLC-MS/MS sviluppato in questo studio, per l'analisi delle FB_1 e FB_2 in mais, è risultato essere preciso, selettivo, ripetibile e soddisfa i criteri di rendimento richiesti dal Reg. CE 401/2006 (4) in termini di recupero percentuale.

Il basso limite di rivelazione ottenuto (LOD = 20 µg/kg), essendo 10 volte inferiore al limite di legge stabilito per gli alimenti destinati alla prima infanzia (3), rende il metodo adatto anche all'analisi dei *baby food*.

Valutazione della tossicità acuta e della risposta trascrizionale su *V. fischeri*

L'ecotossicologia si avvale di test *in vitro* anche su batteri come strumento di screening per monitorare la pericolosità di contaminanti chimici. Tra i più utilizzati, il *Microtox toxicity test system* utilizza *V. fischeri* (ceppo NRRL B11177), un batterio marino naturalmente luminescente e

determina gli effetti tossici come calo della luminescenza, fenomeno quantificabile con precisione grazie all'utilizzo di un luminometro. È possibile perciò, in maniera veloce ed economica, tracciare una curva dose-risposta da cui ricavare il dato della *Median Effective Concentration* (EC_{50}) (la dose che produce il 50% dell'effetto misurabile), a cui è inversamente correlata la tossicità acuta della matrice testata. Oltre la buona sensibilità mostrata dal sistema nei confronti di differenti classi di contaminati (idrocarburi, PCB, insetticidi, erbicidi, ecc.), i vantaggi dei test effettuati al Microtox sono l'economicità, la rapidità e la standardizzazione, tanto che il test è ormai abitualmente inserito nelle batterie di test ecotossicologici che valutano la tossicità acuta di matrici ambientali come acque di superficie e sedimenti.

L'idea di base che si è sviluppata nell'ambito del progetto MITICA è quella di applicare gli stessi protocolli, testati e validati in ambito ambientale, per analizzare la tossicità di composti chimici che sono stati individuati come contaminanti di matrici alimentari. A tale analisi prettamente tossicologica si è affiancare in parallelo l'analisi, tramite la tecnica del *microarray*, degli effetti che tali molecole producono a livello di alterazione nell'espressione genica.

Materiali e metodi

Microtox toxicity test system

I batteri liofilizzati (10^9 unità formanti colonia cfu) vengono, rivitalizzanti in 1 mL di H_2O per 30 min a 4°C quindi equilibrati alla temperatura operativa del test pari a 16° per 15min. 10^7 cfu vegono poi risospesi in soluzione salina (2% NaCl) in presenza del composto in esame diluito in modo da coprire un range ampio di dosi che poi viene ristretto in modo da misurare in modo più preciso la dose EC_{50}. La quantificazione della luminescenza viene effettuata dopo 5 e 15 minuti (metodo APAT CNR IRSA 8030).

Estrazione dell'RNA totale

I batteri sono raccolti per centrifugazione e lisati con lisozima (400 mg/mL in TE) incubando 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo la lisi si procede alla purificazione dell'RNA seguendo il protocollo delle colonnine a scambio ionico RNAesy mini kit della Qiagen. Da 10^8 cfu abbiamo ottenuto una resa media di 3,5 µg di RNA totale che è stato quantificato allo spettrofometro e di cui si è valutata la qualità mediante sistema automatizzato, Bioanalyzer 2100 Agilent, utilizzando l'RNA 6000 Nano LabChip (Agilent).

Analisi trascrizionale mediante *microarray*

200 ng di RNA totale vengono amplificati e marcati con Cy3CTP attraverso fasi successive. L'RNA viene poliadenilato quindi retrotrascritto a cDNA a doppio filamento e in ultimo amplificato linearmente e marcato attraverso una reazione di trascrizione *in vitro* durante la quale il cDNA viene trascritto a cRNA ad opera della T7RNApolimerasi con la contemporanea incorporazione dei nucleotidi marcati. Per le prime due fasi ci si avvale del Kit Ambion *MessageAmp™ II-Bacteria* e per la trascrizione *in vitro*, invece, si utilizza il Kit Agilent *low amount RNA imput fluorescent linear amplification kit*. Con questo protocollo si ottengono in media dai 3 ai 9 microgrammi di cRNA con una ottima frequenza di incorporazione (foi) del nucleotide marcato che supera in molti casi anche le 20 pmoli per microgrammo di cRNA amplificato (valore soglia di accettabilità 9). Dopo aver frammentato il cRNA tramite digestione chimica a 60°C per 30 min si procede all'ibridazione per 17 ore alla temperatura di 65°C. La *slide* viene lavata quindi scansionata utilizzando il sistema Agilent Microarray Scanner.

L'immagine viene analizzata mediante il software di Feature Extraction 9.1 in dotazione allo scanner Agilent che restituisce un valore di intensità di segnale associato ad un errore.

Risultati e discussione

Le matrici alimentari contaminate da FB_1 presentano una co-contaminazione da FB_2 in un rapporto quantitativo mediamente costante che va da 3:1 a 2:1 a favore della FB_1. Il Reg. CE 1881/2006, testo integrato del 23/07/08, impone, nel valutare la conformità di un campione, di analizzare le due Fumonisine nell'insieme. Per questo motivo, si è voluto testare con il sistema Microtox la tossicità acuta delle due Fumonisine sia singolarmente che in differenti combinazioni.

L'analisi della tossicità acuta su *V. fischeri* ci ha consentito di definire i valori di EC_{50} per FB_1 ed FB_2. Come riportato in Figura 3, il Microtox mostra una buona linearità di risposta alle due Fumonisine, con una sensibilità inferiore alla FB_2 (EC_{50} pari a 93 mg/L) rispetto alla FB_1, il cui valore di EC_{50} risulta pari a 7,4 mg/L.
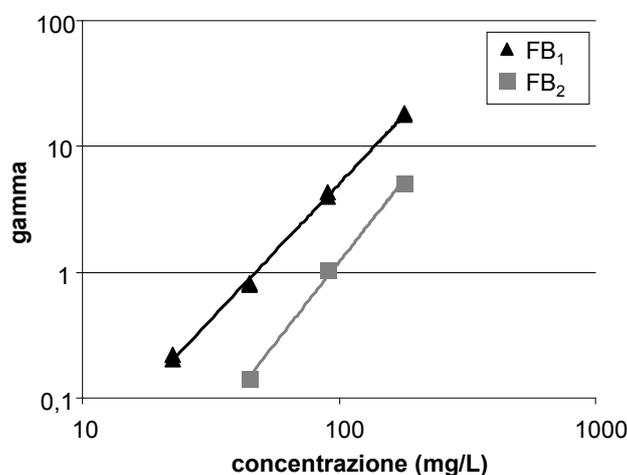
Figura 3. Linearità di risposta del test Microtox "90% basic test for pure compounds" per FB_1 e FB_2 (coefficiente gamma *vs* concentrazione)

Entrambe le Fumonisine sono inibitori competitivi della sintesi *de novo* degli sfingolipidi e sono in grado di inibire la ceramide sintasi. Mentre il profilo tossicologico della FB_1 è abbastanza noto, per la FB_2 sono disponibili ancora pochi dati e ancor meno sul loro effetto combinato (5-14).

Considerando che, entrambe le micotossine provocano sul *V.fischeri* un effetto tossico facilmente quantificabile, diventa di particolare interesse studiarne l'effetto combinato. In Figura 4 è riportato il primo esperimento in cui tre dosi di FB_1, scelte nell'intervallo di linearità di risposta, sono state combinate con un'unica dose di FB_2 (22 mg/L) che non ha effetto tossico. È evidente che, soprattutto alle basse concentrazioni le due micotossine sinergizzano in quanto l'effetto combinato è maggiore della somma dei singoli effetti.

Questo effetto è maggiormente evidente nell'esperimento riportato in Figura 5, dove si è ottenuta una risposta superiore al 50% combinando dosi che singolarmente non davano alcuna risposta quantificabile.
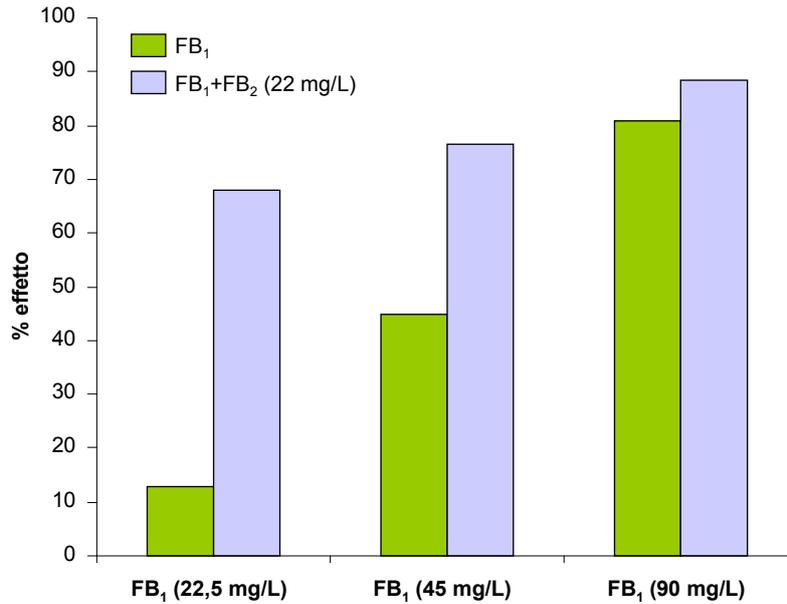
Figura 4. Confronto fra la tossicità acuta al test Microtox di FB_1 e differenti combinazioni di FB_1 e FB_2 (22 mg/L)
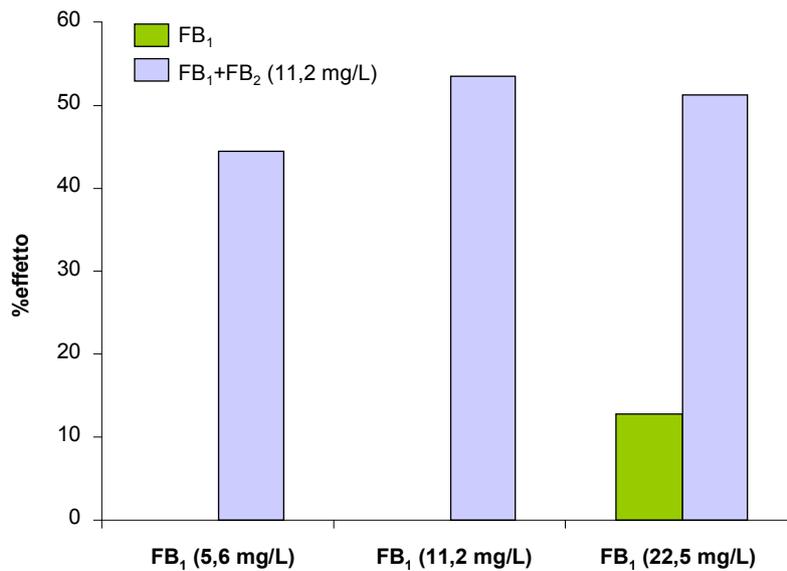
Figura 5. Confronto fra la tossicità acuta al test Microtox di FB_1 e differenti combinazioni di FB_1 e FB_2 (11,2 mg/L)

Nell'intento di comprendere i possibili meccanismi coinvolti nella risposta a trattamenti combinati di FB_1 e FB_2 su *V. fischeri*, abbiamo disegnato una *microarray slide* contenente tutto il genoma del *V. fischeri* ES114, specificamene dedicata allo studio delle variazioni nell'espressione genica.

La tecnologia scelta per la fabbricazione del vetrino *microarray* è la *sure-print inkjet technology* messa a punto da Agilent in cui gli oligonucleotidi vengono sintetizzati *in situ*, cioè base per base direttamente sul vetro chimicamente attivato utilizzando la chimica standard delle fosforammiditi (www.agilent.chem/dnamicroaary).

I vantaggi offerti da questa tecnologia derivano, non solo dal livello molto alto della qualità del vetrino e del singolo *spot* a garanzia di un ottima riproducibilità del dato, ma anche dalla flessibilità della piattaforma facilmente adattabile alle esigenze specifiche del cliente. In tutti i *microarray* dedicati allo studio dell'espressione genica presenti nel catalogo Agilent, gli oligonucleotidi hanno una lunghezza di 60 bp (60-mer).

Molti studi hanno infatti dimostrato che gli oligonucleotidi 60-mer raggiungono in ibridazione il giusto compromesso tra specificità e sensibilità (15). La piattaforma Agilent è già stata utilizzata per il disegno di *microarray* specificatamente dedicati a batteri, con risultati in generale di buona qualità in termini di riproducibilità e accuratezza (16).

Il punto più critico di tutto il processo di progettazione e produzione di un vetrino *microarray* sta principalmente nella selezione degli oligonucleotidi-sonda da utilizzare, ossie nel *probe design*. La temperatura di *melting* (Tm) è il parametro principale per selezionare il set di oligonucleotidi su cui eventualmente applicare ulteriori filtri.

Considerando che il calcolo della Tm reale è però complesso e dipendente da molte variabili, in generale viene approssimato utilizzando il modello "The Nearest Neighbour" (NN). Tale modello assume che l'entropia e l'entalpia totale di una sequenza *duplex* di acidi nucleici derivi dalla somma dei contributi di ciascun coppia di paia di basi vicine. Per ciascuna coppia sia normale che *mismatch* sono calcolati i parametri termodinamici che dipenderanno da energie di accoppiamento e di *stacking*. Al momento i migliori software per il disegno di *probe* per *microarray* calcolano la Tm utilizzano il modello NN con la matrice di parametri SantaLucia 98 (17).

Questo approccio rimane ancora quello più utilizzato e soprattutto l'unico consigliato per il *probe design* in organismi procarioti. Agilent, attraverso il suo portale dedicato al *microarray design* (e-array, https://earray.chem.agilent.com/earray/), offre uno strumento per il disegno degli oligonucleotidi dedicati alla espressione genica basato sul metodo NN-SL98 (*GE probe design tool)*.

Si è deciso quindi di utilizzare questo software per disegnare gli oligonucleotidi necessari per costruire un *microarray* dedicato allo studio di espressione in *V. fischeri*. Il ceppo di cui è stato pubblicato l'intero genoma è il *V. fischeri* ES114, isolato dall'organo luminoso della seppia *Euprymna scolopes* (18). Il genoma è costituito da due molecole di DNA circolari , cromosoma I e II, ed un plasmide caratteristico del ceppo. In Tabella 4 sono elencate alcune caratteristiche generali del genoma di *V.fischeri* ES114 e tutte le sequenze sono state scaricate in formato FASTA dal sito dal database CMR (*Comprehensive Microbial Resource*) del TIGR (The *Institute of Genomic Research*).

Tabella 4. Genoma completo di *V. fischeri* ES114 (18)

Nome	Riferimento sequenza	GenBank	Lunghezza (Mbp)	Contenuto in GC (%)	Proteine	RNA
Cromosoma I	NC_006840	CP000020	2,9	39,0	2586	150
Cromosoma II	NC_006841	CP000021	1,3	37,0	1175	15
Plasmide pES100	NC_006842	CP000021	0,046	38,4	57	-

Abbiamo utilizzato il metodo *best probe*, con una Tm di 80°C, per disegnare il *microarray* di *V. fischeri*, preferendo una sola *probe* per gene replicata più volte rispetto a più *probe* distribuite lungo il gene, forti anche del fatto che molti studi sostengono che per oligonucleotidi della lunghezza di 60 basi una sola *probe* scelta accuratamente sia più che sufficiente.

Per tutte le 3747 *probe* disegnate dal GE *probe design tool* di e-*array* è stata anche valutata la potenzialità di ibridare con un altro gene appartenete al *V. fischeri*, cioè di *cross*-ibridare, mediante l'applicazione software Olicheck. Il formato di *microarray* scelto per il *V. fischeri* è un 8X15K, dove nello stesso vetrino sono contemporaneamente presenti 8 *array* da 15000 *feature* circa.

Per ciascun *array* il *probe-set* del *V. fischeri* è stato replicato 3 volte e in più sono state aggiunte tre repliche di 371 *probe* dirette contro i geni del metabolismo del DNA e detossificazone del *V.cholerae* in modo da verificare anche la specificità delle *probe* di *V.fisheri* rispetto al *V.cholerae*. A questi *probe* sono stati aggiunti da Agilent i controlli positivi e negativi automaticamente aggiunti a seconda del formato scelto.

Il primo esperimento di espressione genica ha voluto verificare la specificità della *slide*. A questo scopo abbiamo effettuato una titolazione combinando percentuali diverse di cRNA marcato di *V. Fisheri* ed *E.coli* per coprire il range 100-0% (Tabella 5).

Tabella 5. Esperimento di titolazione della *slide* per *V. fischeri*

cRNA marcato di *V. Fisheri / E.coli*	% geni differenzialmente espressi (t-test, p<0,05)	*Fold-change*		DS	CV%
		valore medio	valore atteso		
100/75	65	1,31	1,33	0,09	7
100/25	77	3,65	4,00	0,53	14
75/25	72	2,82	3,00	0,30	11

DS: Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

I risultati ottenuti sono soddisfacenti in quanto la correlazione tra *array* replicati è risultata pari a: 0,98-0,99 (Agilent 0,99), la riproducibilità media *inter-arr*ay pari a 0,11-0,19 CV (Agilent 0,08-0,11, considera accettabili sotto 0,2) e la riproducibilità *intra-array* pari a 0,08 a 0,11 CV (Agilent 0,06-0,08).

L'analisi trascrizionale degli effetti dovuti a trattamento con entrambe le micotossine è stata condotta testando in triplo sia le molecole singole ad una concentrazione pari a 16 mg/L che la combinazione 3:1 data da 11,2 mg/L FB_1+5,6 mg/L FB_2. I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando il software Gene Spring GX.

L'analisi della varianza 1-*way* ANOVA con correzione per confronti multipli FDR p<0,05 ha evidenziato che il profilo trascrizionale indotto da FB_1+FB_2 è significativamente differente rispetto a quello associato alle molecole singole che invece differiscono per pochissimi geni.

La Figura 6 riporta l'andamento dei segnali di intensità normalizzati e i risultati della *Principal Component Analysis* .

I risultati preliminari ottenuti sono incoraggianti e confidiamo nel fatto che l'interpretazione biologica delle liste geniche ottenute contribuisca a delucidare i meccanismi d'azione che la combinazione delle molecole esercita su *V. fischeri*.
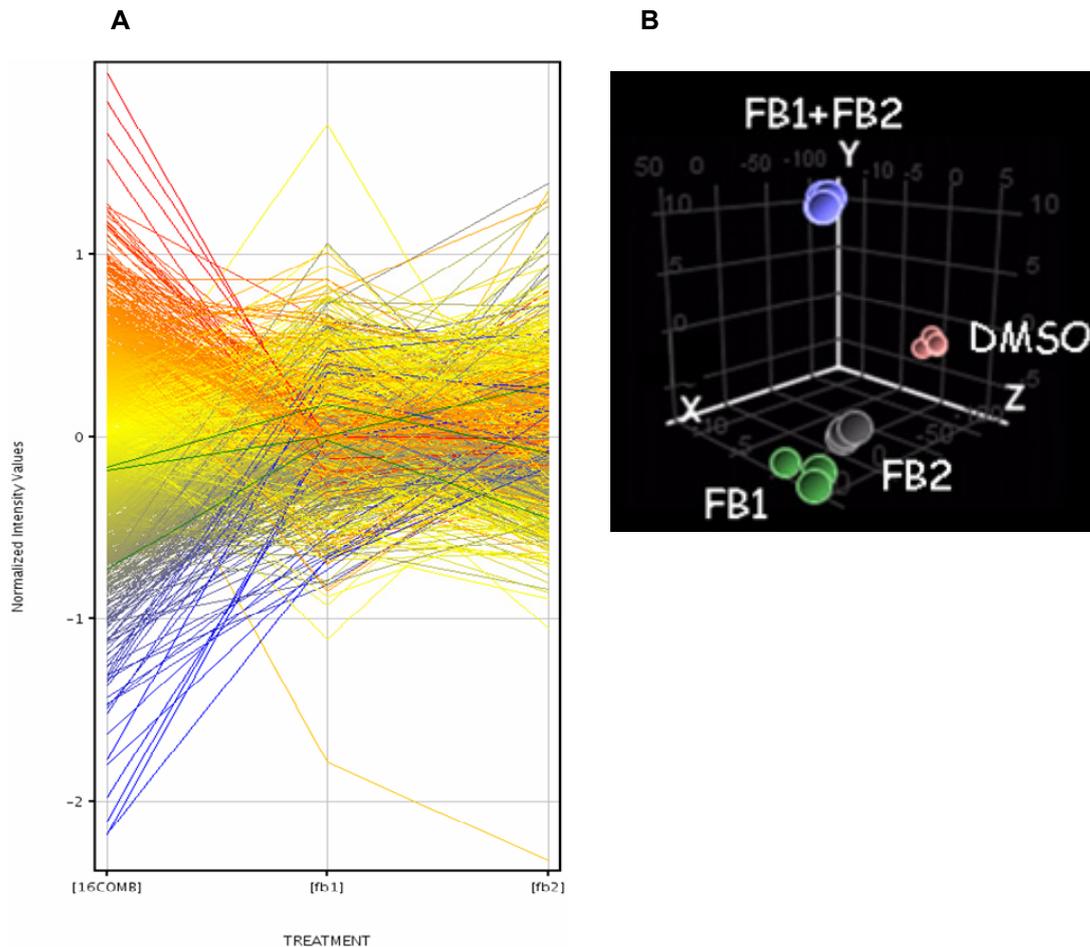
Figura 4. Effetto su *V. fischeri* dovuto a trattamento con FB_1 e FB_2 e loro combinazioni: andamento delle intensità di segnale normalizzate (A) e *Principal Component Analysis* (B)

Bibliografia

1. R-Biopharm-Rhône LTD. *Instruction for use for detection of fumonisins B1, B2 and B3 using HPLC.* Version: P31/V5/26.01.05.

2. Tenaglia H, Venturini E, Raffaelli R. *Linee guida per la validazione dei metodi analitici e per il calcolo dell'incertezza di misura – Accreditamento e certificazione*. Bologna: Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente dell'Emilia Romagna; 2003. (I Manuali di ARPA).

3. Unione Europea. Regolamento CE n. 1126/2007 della Commissione del 28 settembre 2007 che modifica il reg. CE n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le Fusarium-tossine nel granoturco e nei prodotti a base di granoturco. *GUCE* L 255, 29 settembre 2007.

4. Unione Europea. Regolamento CE n. 401/2006 della Commissione del 26 febbraio 2006. Metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *GUCE* L 70, 9 marzo 2006.
5. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Evaluation of certain mycotoxins in food, Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Geneva: WHO; 2002. (WHO Technical Report Series No 906, 16- 26).
6. Scientific Committee on Food. *Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium toxins. Part 3: Fumonisin B1 (FB1). Expressed on 17 October 2000*. Brussels: European Commision; 2000. (SCF/CS/CNTM/MYC/24 Final).
7. Scientific Committee on Food. *Updated opinion of the Scientific Committee on Food on Fumonisin B1, B2 and B3 Expressed on 4 April 2003*. Brussels: European Commision; 2003. (SCF/CS/CNTM/MYC/ 28 Final).
8. Gelderblom WCA, Cawood ME, Snyman SD, Vleggaar R, Marasas WFO. Structure-activity relationships of fumonisins in short-term carcinogenesis and cytotoxicity assays. *American Journal of Epidemiology* 1993;31/6:407-14.
9. Norred WP, Wang E, Yoo H, Riley RT, Merril AH. *In vitro* toxicology of fumonisins and the mechanistic implications. *Mycopathologia* 1992;117:73-8.
10. Riley RT, Showker JL, Owens DL, Ross PF. Disruption of sphingolipid metabolism and induction of equine leukoencephalomalacia by Fusarium proliferatum culture material containing fumonisin B2 or B3. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 1997;3:221-8.
11. Shier WT, Abbas HK, Mirocha CJ. Toxicity of the mycotoxins fumonisins B1 and B2 and Alternaria alternata f.Sp. lycopersici toxin (AL) in cultured mammalian cells. *Mycopathologia* 1991;116:97-104.
12. Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AH. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by Fumonisins. *Journal of Biological Chemistry* 1991;226:14486-90.
13. Murphy PA, Rice JLG, Ross FP. Fumonisin B1, B2, and B3 Content of Iowa, Wisconsin, and Illinois Corn and Corn Screenings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1993;41:263-6.
14. Henry MH, Wyatt RD. The toxicity of Fumonisin B1, B2, and B3, individually and in combination, in chicken embryos. *Poultry Science* 2001;80:401-7.
15. Hughes TR, Mao M, Jones AR, *et al*. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nature biotechnology* 2001;19:342-7.
16. Charbonnier Y, Gettler B, François P, Bento M, Renzoni A, Vaudaux P, Schlegel W, Schrenzel J. A generic approach for the design of whole-genome oligoarrays, validated for genomotyping, deletion mapping and gene expression analysis on Staphylococcus aureus. *BMC Genomics* 2005;6:95-108.
17. Leiske DL., Karimpour-fard A, Hume PS, Fairbanks BD, Gill RT. A comparison of alternative 60-mer probe designs in an in situ synthesized oligonucleotide microarray. *BMC genomics*. 2006;7:72-81.
18. Ruby EG, Urbanowski M, Campbell J, Dunn A, Faini M, Gunsalus R, Lostroh P, Lupp C, McCann J, Millikan D, Schaefer A, Stabb E, Stevens A, Visick K, Whistler C, Greenberg EP. Complete genome sequence of Vibrio fischeri: a symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:3004-9.

SVILUPPO DI UN NUOVO SISTEMA IMMUNOELETTROCHIMICO PER LA DETERMINAZIONE DEL DEOSSINIVALENOLO

Daniela Romanazzo, Silvia Vesco, Giulia Volpe, Francesco Ricci, Danila Moscone, Giuseppe Palleschi
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche,Università di Roma "Tor Vergata", Roma

Introduzione

Il Deossinivalenolo o DON appartiene alla famiglia dei sesquiterpenoidi detti Tricoteceni, metaboliti secondari prodotti da funghi del genere Fusarium. La maggior parte delle materie prime vegetali è suscettibile di contaminazione da parte di queste tossine e la loro presenza nei prodotti agricoli continua ad essere un problema mondiale a causa dell'azione tossica esercitata sull'uomo e sugli animali. I numerosi Tricoteceni conosciuti sono stati suddivisi in quattro gruppi principali in funzione della loro struttura chimica, tra questi i Tricoteceni di tipo-A (in particolare T-2 e HT-2) e di tipo-B (in particolare DON e Nivalenolo) rappresentano quelli più frequentemente rinvenuti nei prodotti agricoli quali farine, insilati, grano, granturco (1).

L'assunzione di bassi livelli di Deossinivalenolo provoca nell'uomo nausea, vomito, dissenteria e immunosoppressione, il DON viene infatti anche detto vomitossina; l'assunzione di più alti livelli può provocare immunosoppressione.

Il DON è stabile fino a 120°C e non si decompone in condizioni debolmente acide (2), è solubile in acqua e in solventi polari quindi in miscele di acqua e metanolo e acqua e acetonitrile. Inoltre queste caratteristiche di solubilità e polarità giustificano la facilità di tali tossine a penetrare le membrane cellulari e la loro successiva interazione con DNA, RNA e organuli subcellulari. La Commissione delle Comunità Europee ha definito i tenori massimi di talune *Fusarium*-tossine contaminanti presenti nelle derrate alimentari rappresentate principalmente da prodotti a base di cereali quali grano e granturco, come riportato in Tabella 1 (3).

Tabella 1. Deossinivalenolo: tenori massimi pubblicati nel Reg. CE 1126/2007

Matrice	Tenore massimo µg/kg
Cereali non trasformati diversi da grano duro, avena e granturco	1250
Grano duro e avena non trasformati	1750
Granturco non trasformato	1750
Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali (compresa la farina di granturco, la semola di granturco e il granturco grits, crusca come prodotto finito commercializzato per il consumo umano diretto)	750
Pasta	750
Pane (compresi piccoli prodotti da forno), prodotti della pasticceria, biscotteria, merende a base di cereali e cereali da colazione	500
Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	200

È fortemente sentita da parte delle industrie alimentari la necessità di disporre di metodi semplici, rapidi e affidabili per accertare la presenza di queste tossine nei prodotti alimentari, e per soddisfare tali esigenze sono in via di sviluppo molti metodi di screening per rivelare i più rappresentativi Tricoteceni (4). Lo scopo del presente lavoro è stato quello di sviluppare un nuovo metodo di screening per la rivelazione del Deossinivalenolo in matrici alimentari a base di cereali; il sistema è rappresentato da un sensore immunomagnetico enzimatico elettrochimico.

Materiali e metodi

Il saggio immunomagnetico enzimatico elettrochimico ELIME (*Enzyme Linked ImmunoMagnetic Electrochemical assay*) utilizza il format del classico saggio *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ma è finalizzato ad elevarne l'efficienza. A tale scopo l'immobilizzazione dei bioreagenti è eseguita su micropalline magnetiche (IMB). Le microparticelle immunomagnetiche sono particelle superparamagnetiche costituite da una dispersione di ossidi di ferro ricoperta da un sottile guscio polimerico utile per l'immobilizzazione di una grande varietà di molecole, per questo lavoro sono state scelte particelle magnetiche tosilattivate. Gli *step* immunologici si susseguono in microtubi di poliestere e al termine di ogni *step* i microtubi vengono inseriti in un apposito concentratore magnetico che trattiene le microparticelle sulle parete interna del tubo; in questo modo si possono alternare nei tubi le soluzioni contenenti i diversi bioreagenti lasciando indisturbate le microparticelle magnetiche. I principali *step* immunologici sono i seguenti: il *coating,* al termine del quale le microparticelle magnetiche si troveranno legate a numerose molecole di DON; il bloccaggio, utile ad evitare legami aspecifici tra le microparticelle e i bioreagenti delle fasi successive al *coating*; la competizione*,* in cui le microparticelle legate a molecole di DON e bloccate vengono incubate con una soluzione contenente un'adeguata diluizione di anticorpo anti-DON (in difetto) e il DON da dosare (presente nel campione o negli standard) che competerà con quello legato alla superficie per i limitati siti anticorpali. L'anticorpo utilizzato nell'analisi è costituito da un frammento Fab (*Antigen Binding Fragments*) specifico per il DON coniugato con una molecola di biotina. L'ultimo *step* è il *labelling,* in cui le microparticelle a cui è legata la catena antigene-Fab-biotina vengono incubate con un complesso molecolare avidina-n(biotina-HRP) allo scopo di legare il Fab-biotina non ad una ma a numerose molecole di enzima perossidasi (HRP).

Al termine di tutti gli *step* immunologici, le particelle immunomagnetiche vengono concentrate sulla superficie dell'elettrodo di lavoro di un elettrodo *screen printed* (SPE) "usa e getta" grazie all'aiuto di un piccolo magnete fissato sotto la sua superficie. Instaurato il contatto elettrico tra l'SPE e il rivelatore di segnale (potenziostato da banco o portatile tipo PalmSens) si misura, con tecnica cronoamperometrica, la corrente generata (potenziale applicato costante di –0,1 V) dalla riduzione all'elettrodo di lavoro del prodotto della reazione enzimatica tra HRP e 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) ridotta in presenza di H_2O_2 (5). L'intensità di tale corrente è inversamente proporzionale alla concentrazione di antigene.

Il saggio ELIME sfrutta la selettività degli anticorpi, la sensibilità della rivelazione elettrochimica, la maneggevolezza degli elettrodi screen printed e la possibilità di concentrare le particelle magnetiche sulla superficie di un elettrodo di lavoro. Lo schema che descrive l'immunosensore è riportato in Figura 1.
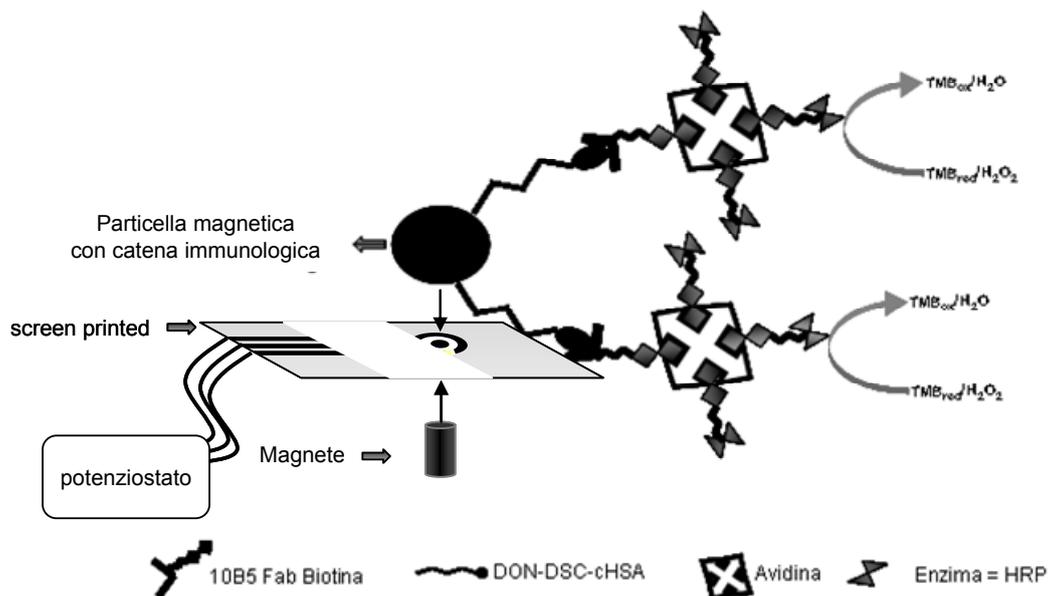
Figura 1. Schema di un saggio competitivo indiretto con l'uso di particelle immunomagnetiche

Saggio ELIME preliminare

Il saggio competitivo definitivo (di cui in Figura 2 si riporta la curva di taratura), in presenza dell'antigene da dosare presente negli standard, è stato eseguito in funzione dei risultati acquisiti nelle prove di ottimizzazione: prove di *binding* antigene-anticorpo hanno permesso di controllare e confermare l'attività dell'anticorpo anti-DON e di scegliere la migliore diluizione di anticorpo da impiegare nel saggio competitivo, risultata di 1:10000 v:v da una soluzione madre di 1 mg/mL. La concentrazione di DON-HSA legato sulle micropalline magnetiche è minore di quella suggerita nel protocollo generale della ditta che le commercializza e corrisponde a 375 µg/mL, dato che il legame tra anticorpo e antigene libero da dosare risulta ovviamente ostacolato da alte concentrazioni di antigene legato che compete.
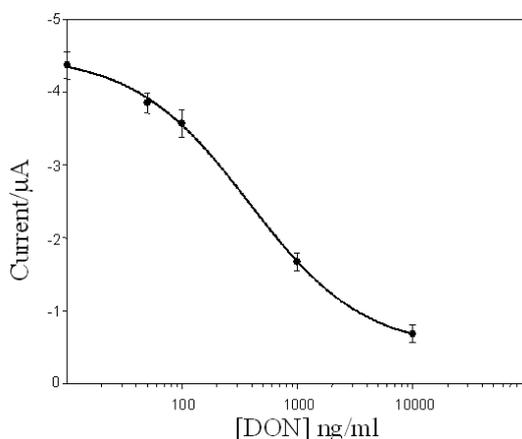
Figura 2. Curva di taratura del saggio competitivo indiretto ELIME

I parametri analitici dell'immunosensore elettrochimico per il DON ottenuti dall'equazione logistica a quattro parametri riferiti alla curva mostrata in Figura 2 sono: LOD = 63 ng/mL, *Median Effective Concentration* (EC_{50}) = 380 ng/mL, intervallo di lavoro = (100-4500) ng/mL, tempo totale di analisi = circa 1 ora e 30 minuti.

Studio dell'effetto matrice

All'ottimizzazione del saggio ELIME in tampone segue lo studio delle possibili interferenze dovute alla matrice alimentare: a tale scopo si mostreranno i risultati ottenuti con campioni di cereali da colazione e con campioni di alimenti per l'infanzia a base di cereali. Al fine di ottenere risultati ottimali, sono state valutate diverse procedure estrattive che sfruttano le caratteristiche di polarità del DON: estrazione con acqua/acetonitrile (84:16), estrazione con acqua/acetonitrile (84:16) e purificazione con Mycosep, estrazione con acqua/acetonitrile (84:16) e purificazione con Bondelut, estrazione con acqua/metanolo (80:20), estrazione con acqua/metanolo (80:20) e purificazione con Bondelut. Alla fine di ogni processo di estrazione, il campione è stato seccato e risolubilizzato in un adatto volume di tampone al fine di far corrispondere il limite di tollerabilità in esame (200 per gli alimenti destinati all'infanzia e 500 per i cereali da colazione) all'interno dell'intervallo lineare della curva di riferimento. Alla matrice così trattata sono state addizionate soluzioni standard di DON, al fine di valutare l'effetto matrice mediante confronto con la curva di taratura in tampone Tris.

A seguito dei test eseguiti sui campioni di alimenti non contaminati, la procedura di estrazione che offre il miglior compromesso tra semplicità di esecuzione e interferenza nell'analisi è risultata la seguente: un'aliquota di 25 g di campione macinato è stata estratta con 100 mL di una soluzione di acetonitrile/H_2O (84:16) e omogeneizzata per 3 minuti. L'omogeneizzato è stato centrifugato per 10 minuti a 6000 rpm. 4 mL di supernatante sono portati a secco sotto atmosfera d'azoto. Il campione di cereali da colazione è stato risolubilizzato in 2 mL di tampone Tris mentre il campione di alimenti destinati all'infanzia in 0,4 mL di tampone Tris. Il recupero medio risultato da questa procedura di estrazione è del 95% per i cereali da colazione e del 105% per gli alimenti destinati all'infanzia.

Cereali da colazione: campioni sperimentalmente contaminati

Si è proceduto con l'analisi di campioni di cereali da colazione sperimentalmente contaminati con concentrazioni di DON pari a 100, 300, 500, 700 e 1000 ng/g. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 2. I valori riportati (deviazione standard relativa RSD e recupero medio) sono la media di 9 determinazioni per ogni livello di concentrazione.

Tabella 2. Analisi ELIME di campioni di cereali da colazione sperimentalmente contaminati con concentrazioni note di DON confrontata con quella degli standard

DON aggiunto (ng/g)	DON trovato (ng/g)	RSD %	Recupero (%)
100	n.d.	–	–
300	268	20	89
500	410	12	82
750	716	15	95
1000	1098	9	110

Cereali da colazione: campioni naturalmente contaminati

Campioni di cereali da colazione naturalmente contaminati dalla tossina DON sono stati analizzati con l'immunosensore ELIME ottimizzato. I risultati sono mostrati in Tabella 3. I valori riportati sono la media di 6 determinazioni per ogni livello di concentrazione.

Tabella 3. Valori di recupero ottenuti dall'analisi, con DON-immunosensore, di campioni di cereali da colazione naturalmente contaminati

Contenuto di DON (ng/g)	DON trovato (ng/g)	Recupero (%)
485±61	475±80	98
364±47	432±55	119
242±31	201±17	83
121±16	n.d.	–

Alimenti per l'infanzia: campioni sperimentalmente contaminati

Si è proceduto con l'analisi di campioni di alimenti destinati all'infanzia a base di cereali sperimentalmente contaminati con concentrazioni di DON pari a 50, 100, 200, 400 e 1000 ng/g.

I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 4. I valori riportati sono la media di 9 determinazioni per ogni livello di concentrazione.

Tabella 4. Valori di recupero del DON-immunosensore ottenuti analizzando campioni di alimenti per l'infanzia sperimentalmente contaminati

DON aggiunto (ng/g)	DON trovato (ng/g)	RSD %	Recupero (%)
50	n.d.	–	–
100	97±33	33	97
200	198±20	10	99
400	434±52	12	108
1000	1050±157	15	105

Conclusioni

È stato messo a punto un sistema immunomagnetico elettrochimico (ELIME) per la determinazione del DON in matrici alimentari a base di cereali. Ottimizzate le condizioni per il saggio ELIME, è stato valutato l'effetto interferente di diverse matrici: cereali da colazione e alimenti per l'infanzia trattati secondo diverse procedure di estrazione. Per entrambe le matrici la procedura di estrazione che offre il miglior compromesso tra semplicità di esecuzione e interferenza nell'analisi è quella che usa come solvente la miscela acetonitrile/acqua in un rapporto 84/16. Affinché l'immunosensore ELIME ottimizzato possa rivelare il DON nei limiti pubblicati sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea, l'estratto deve essere seccato e risolubilizzato in un volume di acqua pari alla metà di quello della miscela estraente per i cereali da colazione e in volume minore di dieci volte rispetto a quello della miscela estraente per gli alimenti per l'infanzia; prima della procedura di essiccazione con questo metodo non è necessario alcun passaggio di purificazione. Gli ottimi risultati acquisiti nei test eseguiti su campioni di cereali da colazione naturalmente contaminati dimostrano l'elevata efficienza di

questo immunosensore, ulteriori test sono attualmente in esecuzione allo scopo di dimostrare l'effettiva trasferibilità del sistema.

Bibliografia

1. Krska R, Baumgartner S, Josephs R. The state of the art in the analysis of type-A and type-B trichothecene mycotoxins in cereals. *Journal of Analytical Chemistry* 2001;371:285-9.
2. Hsueh C, Liu Y, Freund M. Indirect electrochemical detection of type-B trichotecene mycotoxins. *Analytical Chemistry* 1999;71:4075-80.
3. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 1126/2007 della Commissione, del 28 settembre 2007, che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le Fusarium -tossine nel granoturco e nei prodotti a base di granoturco. *GUCE* L 255*,* 29 settembre 2007.
4. Schneider E, Curtui V, Seidler C, Dietrich R, Usleber E, Märtlbauer E. Rapid methods for deoxynivalenol and other trichotecenes. *Toxicology Letters* 2004;153:113-21.
5. Volpe G, Compagnone D, Draisci R, Palleschi G. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as electrochemical substrate for horseradish peroxidase based enzyme immunoassays. A comparative study. *Analyst* 1998;123:1303-7.

IMMUNOSENSORE ELETTROCHIMICO PER LA DETERMINAZIONE DEI TRICOTECENI DI TIPO A IN CEREALI DA COLAZIONE E ALIMENTI DESTINATI ALL'INFANZIA A BASE DI CEREALI

Silvia Vesco, Daniela Romanazzo, Giulia Volpe, Francesco Ricci, Danila Moscone, Giuseppe Palleschi
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma "Tor Vergata", Roma

Introduzione

Le Tossine T-2 ed H-T2 appartengono ai Tricoteceni, un gruppo di metaboliti secondari di specie fungine appartenenti per lo più al genere *Fusarium*. Queste muffe infettano diverse specie vegetali, in particolare cereali, contaminando i relativi prodotti agricoli con i loro metaboliti (1). L'infezione può avvenire nel campo prima della raccolta, ma anche dopo la raccolta, nel caso in cui la derrata non venga adeguatamente conservata. La contaminazione da T-2 ed HT-2 si manifesta di frequente a concentrazioni più basse nelle derrate di frumento, orzo, granturco, segale e a livelli più elevati nell'avena (2).

La presenza dei Tricoteceni nelle derrate alimentari rappresenta un rischio per la salute degli uomini e degli animali: essa è causa di intossicazioni acute e croniche provocando vomito, infiammazioni, emorragie, mancanza di appetito, diarrea, alterazioni ematiche, disordini del sistema nervoso, distruzione del midollo osseo. Il meccanismo secondo cui vengono causati i danni alla salute implica l'interazione delle tossine con DNA, RNA, inibendo la sintesi delle proteine e impedendo la proliferazione dei tessuti (in particolare midollo osseo, sistema immunitario e cellule epiteliali). Le caratteristiche tossicologiche variano a seconda del tricotecene ingerito e della specie animale (o umana) che lo ha assunto: in generale T-2 ed HT-2 sono tra i Tricoteceni con più alto effetto tossico (3). La tossicità di questi due metaboliti è interconnessa e esse non possono essere valutate singolarmente in quanto la Tossina T-2 *in vivo* è rapidamente trasformata in HT-2 all'interno del tratto intestinale. Questo implica che la contaminazione da T-2 ed HT-2 va valutata considerando la presenza complessiva delle due.

I tenori massimi di tossina nelle varie matrici alimentari non sono ancora stati stabiliti ufficialmente dalla Unione Europea in quanto al momento attuale il Comitato Scientifico incaricato non ha valutato sufficienti i dati raccolti; mancano inoltre metodi analitici rapidi standardizzati e gli studi sulla valutazione del rischio per l'alimentazione zootecnica. È stato stabilito tuttavia dalla *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* nel 2001 un valore di TDI (*Tolerable Daily Intake*) pari a 0,06 µg/kg riferito alla somma complessiva di T-2 ed HT-2 (4).

In questo contesto è stato messo a punto un sistema per l'analisi rapida della somma di T-2 ed HT-2. Il metodo è basato su un saggio *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) di tipo competitivo indiretto in cui il supporto solido è rappresentato da microsfere di materiale paramagnetico, accoppiato ad un sistema di rilevazione elettrochimico (5). Il sistema fornisce una misura rapida poichè grazie ad una speciale connessione denominata "Multi-8" è in grado di eseguire automaticamente la misura relativa ad otto campioni o standard di tossina. L'utilizzo delle microsfere magnetiche come supporto solido permette di condurre le reazioni del saggio immunoenzimatico in soluzione senza entrare in contatto diretto col sensore fino al momento della misura.

Il metodo è stato messo a punto su due differenti matrici, cereali da colazione e alimenti a base di mais destinati all'infanzia, a diversi livelli di contaminazione e con diversi probabili limiti di legge (più alto per i cereali da colazione destinati al consumo degli adulti e più basso per gli alimenti destinati all'infanzia con un limite di legge indicato come più probabile pari a 200 ng/g e 25 ng/g rispettivamente).

Materiali e metodi

Per la messa a punto del sistema di analisi sono stati utilizzati campioni bianchi di cereali da colazione e alimenti per l'infanzia privi di contaminanti. I campioni sono stati sottoposti ad estrazione, eventuale purificazione dell'estratto e portati a secco sotto flusso di azoto. L'estratto essiccato è riportato in soluzione con tampone PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e diluito in PBS di un fattore che è funzione del tipo di matrice in esame. L'estratto ricostituito e diluito viene fortificato in modo da avere soluzioni standard di tossina compresi nell'intervallo di lavoro del sistema e la curva di taratura così ottenuta è confrontata con curve di taratura ottenute dagli stessi standard di tossina preparati però in tampone PBS. Per la verifica del suo funzionamento, è stato impiegato lo stesso tipo di matrici naturalmente contaminate.

Reagenti

Tutti i reagenti impiegati sono di grado analitico noto. L'acqua si intende distillata ove non specificato.

- Tampone PBS Dulbecco A.
- Tampone Dietanolammina (DEA): sciogliere 0,0476g di $MgCl_2$ anidro e 5,59g di KCl in ~ 300 mL di acqua, dopo la dissoluzione aggiungere poco per volta 51 mL di DEA (99,5%). Aggiustare il pH a 9,8. Portare al volume finale di 500 mL.
- Tampone Borato: sciogliere 3,09 g di H_3BO_3 in ~ 300 mL di acqua; aggiustare il pH a 9,5 con NaOH (6 M). portare al volume finale di 0,5 L.
- Tampone Tris[idrossimetil]-amminometano: sciogliere 4,85 g in 0,1 L d'acqua e aggiustare il pH con HCl (6M). Portare al volume finale di 0,2 L con acqua.
- Soluzione TRIS + Albumina da Siero Bovino (BSA) (0,1%).
- Soluzione tampone PBS +Tween® 20 (0,05%).
- Soluzione PBS + BSA (0,1%).
- Soluzione PBS + BSA (0,1%) + NaN_3 (0,02%).
- Acetonitrile per HPLC.
- Metanolo per HPLC.
- Solvente di estrazione: acetonitrile-acqua (84:16).
- Solvente di estrazione: metanolo-acqua (80:20).
- Soluzione di bloccaggio: sciogliere 0,2 g di latte in polvere totalmente scremato in 20 mL di PBS.
- Soluzione substrato enzimatico: 1-Naftil fosfato in DEA (1mg/mL).
- Materiale di riferimento Tossina T-2 in polvere.
- Materiale di riferimento Tossina HT-2 in polvere.
- Soluzione standard madre di Tossina T-2, 1 mg/mL in aceto nitrile.
- Soluzione standard madre di Tossina HT-2, 1 mg/mL in aceto nitrile.

- Soluzione standard di lavoro di Tossina HT-2: prelevare 20 µL della soluzione r) e trasferirli in un matraccio tarato da 2 mL contenente circa 1 mL di acetonitrile. Dopo l'aggiunta portare al volume finale di 2 mL con aceto nitrile.
- Soluzioni standard di taratura di Tossina HT-2: prelevare dalla soluzione s) e trasferire in un set di matracci tarati da 2 mL i volumi riportati in Tabella 1.
- Soluzioni in PBS di anticorpo monoclonale HT-2 C-12 B8.
- Soluzioni in PBS di anticorpo secondario coniugato con Fosfatasi Alcalina (diluizione 1:100).

Tabella 1. Aliquote da prelevare e soluzioni da utilizzare per la preparazione dellesoluzioni standard di taratura per la Tossina HT-2

Soluzione standard di taratura	Concentrazione di tossina (ng/mL)	Soluzione utilizzata	Volume prelevato (µL)
n. 1	100	Soluzione standard di lavoro	20
n.2	20	Soluzione standard di taratura n° 1	400
n. 3	8	//	160
n. 4	6	//	120
n. 5	4	//	80
n. 6	2	//	40
0	0	PBS	0

Apparecchiature

La strumentazione utilizzata è di seguito elencata:

- Bilancia analitica.
- Bilancia tecnica.
- Omogenizzatore ad alta velocità.
- Centrifuga da banco.
- Colonnina di purificazione Mycosep 227 ® Trich+.
- Colonnina purificazione Bond Elut.
- Tubi da saggio in vetro da 4 mL.
- Sistema di portata a secco in flusso di azoto.
- Concentratore di microparticelle magnetiche.
- Cronometro.
- Computer portatile.
- Potenziostato portatile.

Messa a punto del metodo

È stata studiata la messa a punto di un metodo rapido per l'esecuzione di analisi di screening su campioni di cereali destinati al consumo umano nell'infanzia e nell'età adulta, eseguibili anche da personale non specializzato. Requisito fondamentale di una metodica di screening, oltre alla rapidità del metodo, è quello di evitare i risultati falsi conformi. L'efficienza del metodo è stata dunque valutata calcolando i valori di recupero su campioni naturalmente e sperimentalmente contaminati in condizioni di misura ottimizzate.

Ottimizzazione del sistema

Sono stati ottimizzati in primo luogo parametri immunologici del saggio ELISA competitivo indiretto quali: la selezione dell'anticorpo specifico più adatto, la quantità di Tossina HT-2 da immobilizzare, la quantità di anticorpo monoclonale specifico per T-2 ed HT-2. La selezione del clone è stata fatta in base ai valori di *cross* reattività che i vari anticorpi a nostra disposizione avevano nei confronti delle due tossine da analizzare. È stato scelto il clone HT-2 C12 B8 la cui *cross* reattività era più simile nei confronti delle due tossine; in questo modo è possibile determinare correttamente la somma delle due tossine.

La quantità di tossina da immobilizzare sulla superficie delle microparticelle magnetiche così come la concentrazione di anticorpo specifico da utilizzare sono state studiate attraverso curve di *binding*. Le prestazioni del sistema sono state valutate eseguendo l'analisi su soluzioni standard di tossina preparate in tampone fosfato. I risultati ottenuti in termini di limite di rivelazione sono soddisfacenti e adatte all'analisi dei campioni di cereali da colazione e alimenti per l'infanzia a base di cereali tenendo presente i limiti proposti ma non ufficializzati per queste due matrici (25 ng/g e 200 ng/g rispettivamente).

Quantitativo di campione da sottoporre ad analisi

Il quantitativo di campione da sottoporre ad analisi deve essere sufficientemente ampio in modo tale da minimizzare l'eterogeneità della contaminazione da Tricoteceni su un campione solido di cereali. Per questo motivo l'estrazione viene eseguita su un campione di 25g come suggerito in letteratura (6).

Trattamento del campione

Il trattamento del campione prevede una fase di estrazione e una eventuale fase di purificazione dell'estratto. Sono state studiate diverse combinazioni tra solvente di estrazione e strategia di purificazione: estrazione con acetonitrile/acqua (84:16) o con metanolo/acqua (80:20) e purificazione con colonnina Mycosep o colonnina Bond Elut.

I valori di recupero su estratti non purificati mostrano una sovrastima dovuta all'effetto matrice che indica la necessità del passaggio di purificazione. I valori di recupero ottenuti da estratti purificati hanno invece riportato un recupero intorno al 100% per entrambi i tipi di colonna esaminati, nel caso in cui l'estrazione sia stata eseguita con la miscela acetonitrile/acqua. A parità di prestazioni in termini di valori di recupero, è stato selezionato per il protocollo l'impiego della colonnina Mycosep, in quanto di più rapido e facile utilizzo e quindi più idonea ad un'analisi di screening (6).

Fattore di diluizione

Il fattore di diluizione dell'estratto essiccato e ricostituito in PBS è stato scelto in funzione del limite di legge della specifica matrice in esame in modo tale da far ricadere il segnale relativo ad un campione con un contenuto di tossina pari al limite di legge nel mezzo dell'intervallo di lavoro.

Condizioni elettrochimiche di misura

Il saggio ELISA elettrochimico viene effettuato tramite un anticorpo secondario coniugato con Fosfatasi Alcalina come marcatore. La lettura è eseguita utilizzando come substrato della Fosfatasi Alcalina l'1-Naftil Fosfato, trasformato in 1-Naftolo per idrolisi. La quantificazione dell'1-Naftolo è condotta applicando condizioni elettrochimiche già da noi standardizzate e riportate in letteratura (7):

- Tampone di analisi: DEA pH 9,8.
- Potenziale inizio scansione: 0 (V).
- Potenziale fine scansione: 0,6 (V).
- Altezza dello *step*: 0,016 (V).
- Altezza dell'impulso: 0,0339 (V).
- Velocità di scansione: 0,1 (V/s).
- Larghezza impulso: 0,06 (s).

Risultati e discussione

L'applicabilità del sistema ottimizzato è stata valutata esaminando i valori di recupero relativi ad una serie di campioni naturalmente contaminati. È stato analizzato un campione di cereali da colazione, mentre per quanto riguarda gli alimenti destinati all'infanzia a base di mais, un campione con un'elevata contaminazione naturale di tossina è stato omogeneizzato in diverse proporzioni con un campione bianco della stessa composizione. I valori ottenuti sono riportati rispettivamente nelle Tabelle 2 e 3.

Tabella 2. HT-2/T-2: risultati di analisi su campioni di cereali da colazione naturalmente contaminati

Contenuto endogeno di HT-2/T-2 (ng/g)	Giorno di analisi	Contenuto di HT2-2/T-2 ± DS (ng/g)	Recupero (%)
80±15	1	n.d.	-
	2	n.d.	-
	3	100±3	125±4

DS: Deviazione Standard

Tabella 3. HT-2/T-2: risultati di analisi su campioni di alimenti destinati all'infanzia naturalmente contaminati

Campione contaminato/ campione bianco	Contenuto endogeno di HT-2/T-2 (ng/g)	Giorno di analisi	Contenuto di HT2-2/T-2 ± DS (ng/g)	RSD (%)	Recupero (%)
10/90	6,90	1	14,1 ± 0,3	2,0	204
30/70	20,70		26±1	4,0	126
50/50	34,50		37±1	3,0	108
75/25	51,75		42±6	14,0	81
100/0	69,00		47±4	9,0	68
10/90	6,90	2	15,6±0,7	4,0	226
30/70	20,70		25,1±0,6	2,0	121
50/50	34,50		41,0±0,3	0,7	119
75/25	51,75		55±1	2,0	106
100/0	69,00		60±3	5,0	87

DS: Deviazione Standard

Per i cereali da colazione si può osservare come con un'opportuna diluizione dell'estratto ricostituito si possa determinare il contenuto di tossina con un valore intorno al 120%.

Per quanto riguarda i campioni di alimenti per l'infanzia vediamo che i campioni con un contenuto complessivo di tossine pari al limite di legge, il cui segnale ricade nell'intervallo di lavoro, possono essere quantificati con un recupero intorno al 100%. Nello stesso tempo, i campioni il cui contenuto di tossina è al di fuori dell'intervallo di lavoro possono comunque essere valutati distinguendo tra campioni conformi al limite di legge e campioni non conformi. Non sono stati rilevati falsi positivi.

Il metodo sviluppato è una valida alternativa ai metodi di screening tradizionali basati su tecniche ELISA a rilevazione spettrofotometrica per la determinazione della concentrazione complessiva delle tossine T-2 ed HT-2, poiché in grado di fornire risultati in tempi più rapidi (1,5 ore rispetto alle 3,5 ore di un saggio ELISA spettrofotometrici).

Bibliografia

1. Koch P. State of the art of trichothecenes analysis. *Toxicology Letters* 2004;153:109-12.
2. GLM Gruppo di lavoro Micotossine. *Sintesi del V forum Fusarium Tossine DG-SANCO UE BRUXELLS del 10 e 11 gennaio 2008*. Disponibile all'indirizzo http://www.micotossine.it/public/pag_561.pdf; ultima consultazione 13/9/10.
3. Schlatter J. Toxicity data relevant for hazard characterization. *Toxicology Letters* 2004;153:83-9.
4. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 856/2005 della Commissione del 6 giugno 2005 che modifica il regolamento (CE) n. 466/2001 per quanto riguarda le *Fusarium*-tossine. *GUCE* L143, 7 giugno 2005.
5. Delibato E, Bancone M, Volpe G, De Medici D, Moscone D, Palleschi G. Development and Comparative Evaluation of Different Screening Methods for Detection of *Staphylococcus aureus*. *Analytical Letters* 2005;38:1569-86.
6. Krska R, Baumagartner S, Josephs R. The state-of-the-art in analysis of type A trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius' Jourmal of Analytical Chemistry* 2001;371:285-99.
7. Micheli L, Radoi A, Guarrina R, Massaud R, Moscone D, Palleschi G. disposable immunosensor for determination of domoic acid in shellfish. *Biosensors and Bioelectronics* 2004;20:190-6.

LABORATORIO NAZIONALE DI RIFERIMENTO PER LE MICOTOSSINE: UN ANNO DI ATTIVITÀ (2008-2009)

Carlo Brera, Barbara De Santis, Emanuela Gregori, Clara Berdini, Francesca Debegnach, Elena Pannunzi, Marina Miraglia
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Con lo scopo di assicurare un approccio armonizzato in materia di controlli ufficiali, il Reg. CE 882/2004 (1) stabilisce, fra le altre attività, che vengano nominati i Laboratori Comunitari di Riferimento (*Community Reference Laboratory*, CRL) per i mangimi e gli alimenti, che questi agiscano in maniera integrata con la rete dei Laboratori Nazionali di Riferimento (LNR) e che congiuntamente operino secondo procedure approvate internazionalmente con metodi di analisi validati.

I laboratori di riferimento comunitari e nazionali sono designati rispettivamente dalla Commissione Europea in base al Reg. CE 776/2006 (2) e dalle Autorità governative preposte di ciascuno Stato Membro in funzione della consolidata esperienza per i diversi settori di competenza nelle analisi di mangimi e alimenti. Il laboratorio comunitario di riferimento per le micotossine nei mangimi e alimenti è il *Joint Research Centre for mycotoxins* (JRC) sito a Geel (Belgio), mentre il Reparto Organismi Geneticamente Modificati e Xenobiotici di Origine Fungina del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare (DSPVSA), ex Centro Nazionale per la Qualità e per i Rischi Alimentari, è stato designato Laboratorio Nazionale di Riferimento per le micotossine dal Ministero della Salute in ottemperanza al Regolamento 882/2004.

Le attività di tali laboratori devono coprire tutti gli ambiti della normativa in materia di mangimi e di alimenti e di salute degli animali, in particolare quelli in cui vi è la necessità di risultati analitici e diagnostici altamente accurati. La elevata qualità e uniformità dei risultati analitici nell'ambito del controllo ufficiale è assicurata dalle attività di tali laboratori di riferimento comunitari e nazionali che sono chiamati a rendere disponibili metodi analitici validati, ad assicurare che siano disponibili materiali di riferimento, ad organizzare test comparativi interlaboratorio e non ultimo a garantire la programmazione periodica di piani di formazione del personale di laboratorio.

Attività

I compiti specifici che ciascun Laboratorio Nazionale deve assolvere, a supporto tecnico per la verifica della conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali sempre dinamico, sono specificati all'articolo 33 del Reg. CE 882/2004. Innanzitutto la collaborazione con il CRL-*Mycotoxin* che organizza nella sua sede di Geel periodicamente ogni anno riunioni plenarie con i laboratori nazionali degli altri Stati Membri Europei. In tale occasione è possibile confrontarsi con tutta la rete di laboratori nazionali europei, unitamente ad una consistente partecipazione di un numero di laboratori nazionali non europei che ha in questa sede la possibilità di rapportarsi con le realtà europee.

Oggetto di tali riunioni sono un puntuale aggiornamento sulle metodiche, la presentazione dei rapporti sui *proficiency test* organizzati ma, soprattutto, scambi su le più diverse problematiche analitiche che caratterizzano l'analisi delle micotossine. Durante i passati incontri al JRC di Geel con il CRL *Mycotoxins* e tutta la rete dei laboratori nazionali, sono stati discussi i risultati dei vari *proficiency testing* organizzati; sono state discusse le modalità di calcolo dei limiti di quantificazione e rivelazione analitico. Sono anche state presentate metodiche analitiche e strumentali specifiche in uso presso alcuni laboratori, come l'analisi di micotossine con la tecnica di cromatografia liquida con spettrometria di massa e l'analisi di Tricoteceni con tecniche elettrochimiche.

Un altro compito degli LNR è il coordinamento, nella loro sfera di competenza, delle attività dei laboratori ufficiali responsabili delle analisi del controllo ufficiale. Nelle sua veste istituzionale già da molti anni il Reparto Organismi Geneticamente Modificati e Xenobiotici di Origine Fungina ha istaurato con le realtà dei laboratori pubblici coinvolti nel controllo ufficiale, rapporti di collaborazione che si sono consolidati nel tempo; oggi anche come LNR-Micotossine, prosegue tale attività con la finalità di informare, formare e supportare le strutture di laboratorio a cui affiancare una reale attività di coordinamento in un momento cruciale di generale riorganizzazione di tutto l'impianto delle attività di controllo ufficiale degli alimenti e mangimi in Italia. L'attività di programmazione è iniziata con una prima riunione, tenutasi nel marzo 2009, che ha aperto un tavolo di comunicazione con gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), i Laboratori periferici e le ASL e che proseguirà con appuntamento annuale. Durante la prima riunione si sono acquisite informazioni tecniche per avere informazioni generali sulla tipologia di strumentazione in dotazione e sui metodi di analisi in uso presso tali laboratori. Si è per questo distribuito un questionario per raccogliere non solo informazioni generali ma anche per fare esplicita richiesta riguardo le necessità e priorità per ciò che riguarda i *proficiency testing* o studi di validazione da organizzare.

Resoconto dei dati raccolti dalle risposte al questionario inviato agli IZS - marzo 2009

Strumentazione

Per quanto riguarda la strumentazione tutti gli IZS, tranne uno, dispongono di strumentazione per l'analisi in cromatografia liquida (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), cromatografia liquida-spettrometria di massa ed *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA).

I laboratori non preparano lo *slurry* del campione e preferiscono manipolare il campione a secco, macinandolo con strumentazione a disposizione del laboratorio.

Sistema di qualità

Tutti i laboratori hanno implementato un sistema qualità e il 67% dei laboratori è accreditato secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005. I metodi acccreditati riguardano l'analisi delle principali micotossine (Aflatossine totali, Aflatossina M_1, Ocratossina A, Zearalenone, Deossinivalenolo, Fumonisine) nei cereali e mangimi, principalmente.

I metodi accreditati prevedono l'analisi in HPLC ad eccezione di un 5% che viene eseguito in ELISA.

Tutti i laboratori accreditati utilizzano Materiali di Riferimento Certificati (*Certified Reference Material*, CRM) e carte di controllo per tenere sotto controllo il dato analitico; partecipano a circuiti FAPAS (*The Food and Environment Research Agency*) e studi

interlaboratorio per il controllo di qualità esterno. Tutti i laboratori calcolano il recupero per esprimere il risultato delle analisi.

Tutti i laboratori effettua il calcolo dell'incertezza di misura, solo il 33% valuta tale contributo secondo l'equazione di Horwitz.

Studi interlaboratorio

L'interesse maggiore espresso per gli studi interlaboratorio riguarda studi per: Aflatossina M_1 in latte; Fumonisine in mangimi/cereali; Aflatossina B_1 in *baby food*/frutta secca; Ocratossina A in caffè; Deossinivalenolo in mangimi/cereali.

Studi di validazione e studi interlaboratorio

Il Reparto Organismi Geneticamente Modificati e Xenobiotici di Origine Fungina da tempo organizza nell'ambito di progetti di ricerca studi di validazione di metodi per l'analisi di micotossine. A tal proposito si ricordano: i) lo studio di validazione per la determinazione della Ocratossina A in campioni di cacao in polvere (2004/2005) (3); ii) lo studio di validazione per la determinazione della Aflatossina B_1 nel mais (2006) (4); iii) lo studio interlaboratorio per la validazione di un metodo immunoenzimatico per la determinazione del Deossinivalenolo (DON) in campioni di grano tenero (2006/2007 e 2008/2009 (5); e infine, iv) lo studio interlaboratorio per la validazione di un metodo immunoenzimatico per la determinazione delle Fumonisine B_1 e B_2 in campioni di mais (2007/2008) (5).

Non potendo contare su risorse economiche dedicate, LNR-Micotossine ha sfruttato l'espletamento di attività legate a progetti di ricerca dell'anno 2009, per coinvolgere i laboratori del Servizio Sanitario Nazionale e laboratori privati nazionali e internazionali che si occupano di micotossine nell'organizzazione di due studi di collaborazione: i) uno studio interlaboratorio per la determinazione in HPLC dell'Ocratossina A in campioni di prosciutto crudo (risultati in fase di elaborazione); ii) uno studio per la validazione di un metodo immunoenzimatico per la determinazione del Deossinivalenolo (DON) in campioni di grano tenero (2008/2009).

Per l'anno 2010 è prevista l'organizzazione di due studi collaborativi su le matrici e le micotossine che saranno risultate di interesse nell'ambito delle riunioni con la rete del Sistema Sanitario Nazionale.

L'LNR si prefigge inoltre di offrire assistenza scientifica e tecnica all'Autorità Competente per l'attuazione di piani di controllo coordinati avendo finora partecipato alla stesura del:

- Piano Nazionale anno 2008 di Sorveglianza e di Vigilanza Sanitaria sull'Alimentazione degli Animali (PNAA 2008, 2009 e 2010)
- Piano Nazionale per la ricerca dei Residui negli animali e nei prodotti di origine animale anno 2008 (PNR 2008).

Accreditamento

Nel Regolamento di riferimento per le attività dei laboratori nazionali di riferimento si legge che "Le autorità competenti possono designare soltanto i laboratori che operano, sono valutati e accreditati conformemente alle seguenti norme europee:

- UNI CEI EN ISO/IEC 17025 su "Criteri generali sulla competenza dei laboratori di prova e di taratura";
- UNI CEI EN 45002 su "Criteri generali per la valutazione dei laboratori di prova";
- UNI CEI EN 45003 su "Sistemi di accreditamento dei laboratori di taratura e di prova – requisiti generali per il funzionamento e il riconoscimento".

L'LNR-Micotossine, al fine di fornire prestazioni e risultati analitici qualificati e riconosciuti in ambito nazionale e internazionale, opera in base allo sviluppo di una politica della qualità conforme alla suddetta norma per l'accreditamento dei laboratori di prova (UNI CEI EN ISO/IEC 17025) implementata già dal 2006 e oggi, l'LNR-Micotossine risulta nella lista dei laboratori accreditati del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare con numero n. 0779 da parte del SINAL (Sistema Nazionale Accreditamento Laboratori, oggi Sistema Italiano di Accreditamento, ACCREDIA).

I metodi analitici applicati dall'LNR-Micotossine ricadono tutti sotto il Sistema Gestione Qualità; fra questi alcuni sono accreditati mentre altri sono in fase di accreditamento. Sono riportati in elenco le prove accreditate che esegue l'LNR-Micotossine. Nella tabella 1 sono riportati la matrice, la micotossina determinata, i documenti di riferimento e le informazioni sullo stato di accreditamento.

Tabella 1. Metodi accreditati in uso nell'LNR per la determinazione delle micotossine

Materiale/prodotto/matrice	Denominazione della prova	Norma/metodo di riferimento
Mais e mangimi	Aflatossina B_1	interno OG-Met,AF.IV/2006 (6)
Burro di arachidi, pasta di pistacchio	Aflatossine $B_1G_1B_2G_2$	UNI EN 14123:2008
Latte e latte in polvere	Aflatossina M_1	UNI EN 14501:2008
Grano e prodotti derivati	Ocratossina A	interno OG-Met,OTA.IV/2006 (estensione del metodo UNI EN14132:2003)
	Deossinivalenolo	interno OG-Met,DON-I/2006 (7)

Al fine di operare in conformità con la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 per mantenere il controllo di qualità esterno, il Laboratorio partecipa regolarmente ai programmi del FAPAS® (*Central Science Laboratory*, Sand Hutton, York, UK). Il reparto vanta la partecipazione a questo circuito da almeno quindici anni, garantendo sempre risultati molto soddisfacenti. Per l'anno 2008/2009 il laboratorio ha partecipato al circuito FAPAS® per l'analisi dell'Ocratossina A in baby food, nella paprika, nel caffé e nel vino; delle Aflatossine nel mais e nei mangimi; del Deossinivalenolo nella farina di grano (Tabella 2).

Tabella 2. Partecipazione ai circuiti FAPAS 2008-2009 e valori degli z-*score* ottenuti

Micotossina	Test FAPAS	Matrice	z-*score*
Ocratossina A	1772	alimenti per l'infanzia a base di cereali	0,5
	1773	paprica	0,6
	1775	vino	0,3
	1778	alimenti per l'infanzia a base di cereali	0,2
Aflatossine totali	4122	mais	0,2
	4124	mangime	1,0
	4133	fichi secchi	1,0
	4148	mais	0,7
Aflatossina M1	4146	latte	0,2
Deossinivalenolo	2247	farina di grano	0,5
	2259	farina di grano	0,6

L'LNR partecipa costantemente anche all'attività organizzata dal Laboratorio Comunitario (CRL Mycotoxin JRC-Geel) per la validazione di metodi per le micotossine. Dietro il coordinamento del CRL-Mycotoxins, il Laboratorio ha partecipato a Proficiency Tests organizzati per i soli LNR europei quali quello organizzato per l'analisi del Deossinivalenolo nei cereali, l'Ocratossina A nei mangimi, la T-2 e HT2 nella farina di cereali, l'Ocratossina A nelle spezie, le Aflatossine nel burro di arachidi.

Sito web

Oggi qualsiasi attività di coordinamento che sia indirizzata sul territorio deve essere supportata con una interfaccia informatica aggiornata sia per dare visibilità che per assicurare una adeguata divulgazione delle attività e delle informazioni in generale. L'LNR-Micotossine ha recentemente lanciato il suo sito (www.iss.it/mico) che è attivo presso il sito web dell'Istituto Superiore di Sanità con un *link* specifico. A causa della sua nuova istituzione, esso è in continua evoluzione per il suo miglioramento grazie al lavoro costante di aggiornamento e ottimizzazione realizzato dal personale del Reparto. Le sezioni attive sono:

- Chi siamo
- Attività di controllo
- Metodi di analisi
- Pubblicazioni
- Documenti
- Eventi
- Normativa
- Eventi
- IUPAC Mycotoxin Newsletter → (http://www.iss.it/myconews).

È prevista anche una sezione dedicata ai laboratori pubblici del sistema Nazionale con entrata riservata e controllata. La presenza di questo strumento dovrebbe facilitare lo scambio di informazioni fra i laboratori della rete del Sistema Sanitario Nazionale avendo come prime finalità quelle di aggiornare e condividere le informazioni in possesso e di armonizzare le procedure analitiche in tutto il territorio. Ad oggi l'accesso alla Araea Riservata non è stato ancora avviato ma sarà predisposto quanto prima attraverso l'utilizzo di *username* e *password.*

Nel sito particolare rilievo ha la sezione *Mycotoxin Newsletter* a cui si può accedere anche direttamente (www.iss.it/myconews) che vuole rappresentare una finestra sulle attività che si svolgono sul tema delle micotossine a livello internazionale. In particolare in questa sezione sono raccolte informazioni tecnico-scientifiche, linee guida, pubblicazioni ed eventi congressuali di maggiore interesse a livello mondiale.

Bibliografia

1. Unione Europea. Regolamento (CE) 882/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali. *GUCE* L 165, 30 aprile 2004.

2. Unione Europea. Regolamento (CE) N. 776/2006 della Commissione del 23 maggio 2006 che modifica l'allegato VII del regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i laboratori comunitari di riferimento. *GUCE* L 136, 24 maggio 2006.

3. Brera C, Grossi S, Miraglia M. Interlaboratory study for ochratoxin a determination in cocoa powder samples. *The Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2005;28(1):35-62.

4. Brera C, Debegnach F, Minardi V, Pannunzi E, De Santis B, Miraglia M. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin B1 in corn samples: interlaboratory study. *Journal of AOAC International* 2007;90(3):765-72.
5. Brera C, Debegnach F, De Santis B, Pannunzi E, Berdini C, Prantera E, Miraglia M. Validazione di metodi immunoenzimatici per la determinazione delle micotossine in campioni di cereali. In: *Micotossine nei cereali. Risultati del progetto interregionale "MICOCER".* Firenze: Accademia dei Georgolfili; 2009. (*Quaderni* 2008-IV).
6. Stroka J, von Holst C, Anklam E. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of Aflatoxin B1 in cattle feed: collaborative study. *Journal of AOAC International* 2003;86:1179-86.
7. MacDonald SJ, Chan D, Brereton P. Determination of Deoxynivalenol in cereals and cereal products by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: interlaboratory study. Journal of *AOAC International* 2005;88:1197-204.

MATERIALI DI RIFERIMENTO PER LA DETERMINAZIONE DI MICOTOSSINE E LA VALUTAZIONE DI CONTAMINAZIONI FUNGINE IN PRODOTTI ALIMENTARI

Rosanna Gatti, Ilaria Lamberti, Lucia Mosiello, Giovanna Zappa, Claudia Zoani
Dipartimento Biotecnologie Agroindustria e protezione della Salute, Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile (ENEA), Centro Ricerca Casaccia, Roma

Introduzione

Le nuove definizioni approvate dalla *International Organization for Standardization-Committee on Reference Materials* ISO-REMCO (1) e quelle riportate nella nuova edizione del Vocabolario Internazionale di Metrologia (VIM) (2), ampliano e chiariscono il campo di applicazione dei materiali di riferimento (*Reference Material*, RM) e dei materiali di riferimento certificati (*Certified Reference Material*, CRM). In particolare, al fine di ampliare il campo di applicazione dei RM alle indagini di tipo qualitativo, nella nuova definizione non compare più il concetto di "valore" attribuito alle specifiche proprietà del RM. Viene inoltre chiarito che "RM" è un termine generale, riferito a materiali da impiegare per diversi scopi (taratura, valutazione di un metodo di misurazione, assegnazione di valori a materiali, controllo di qualità) e viene sottolineata la stretta correlazione tra idoneità del RM e specifico scopo. Nella definizione di CRM il termine *value* viene mantenuto in associazione alle proprietà certificate, ma anche in questo caso è previsto un impiego nelle indagini qualitative, allargando il concetto di "valore" a caratteristiche come l'"identità" e la "sequenza". Inoltre, rispetto alla precedente definizione di CRM, viene aggiunto l'aggettivo "metrologica" al termine "riferibilità" per evitare la confusione tra i due diversi significati del termine *traceability*: rintracciabilità di prodotto e riferibilità metrologica. Come sottolineato da Emons (3), il termine *Reference Material* (RM) non va quindi impiegato in contrapposizione al termine *Certified Reference Material* (CRM) con il significato di "RM non-certificato", in quanto si tratta di un termine generale che indica una famiglia all'interno della quale si possono identificare diverse tipologie di materiali da impiegare con diversa finalità all'interno del processo di misurazione. La terminologia legata ai RM risente di una certa confusione dovuta al diffondersi nei vari settori applicativi di termini, diversi per l'ambito metrologico e per l'ambito dell'assicurazione di qualità, connessi spesso più alla finalità di utilizzo che non al tipo di RM. Alcuni esempi sono i seguenti: *Measurement standard*, *Reference standard, Analytical standard*, *Laboratory standard*, *Reference substance*, *Standard material, Proficiency Testing Material*, *Laboratory Reference Material*, *Laboratory Control Material*, *Quality Control Material*, *Calibration Material*.

In Figura 1 si riporta una rappresentazione grafica della famiglia dei RM (insieme A), nella quale si evidenziano le relazioni tra i sottogruppi dei CRM (sottoinsieme B), *Calibrant*-RM (sottoinsieme C) e *Matrix*-RM (sottoinsieme D) (4). I CRM, come risulta dalle definizioni ISO-REMCO e VIM, sono RM ($B \subset A$) caratterizzati mediante una procedura metrologicamente valida per una o più proprietà e accompagnati da un certificato che ne fornisce i valori, l'incertezza e la riferibilità metrologica.
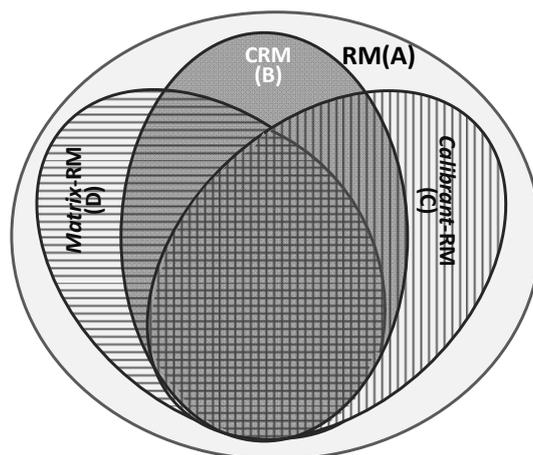
Figura 1. Famiglia dei materiali di riferimento

I *Calibrant*-RM sono RM (C⊂A) in cui il valore di una o più proprietà è metrologicamente riferibile, con un'incertezza idonea all'impiego per una specifica taratura (5) e quindi, a differenza dei CRM, possono anche non essere accompagnati da un certificato conforme ai requisiti della Guida ISO-REMCO 31 (6). I *Matrix*-RM sono materiali stabili e omogenei per una o più proprietà (D⊂RM), quanto più possibile simili – per composizione e stato chimico e chimico-fisico – ai campioni da analizzare, utilizzati in più fasi del processo di misurazione per diversi scopi, quali il controllo degli effetti-matrice, l'individuazione delle fonti di incertezza e i controlli di qualità (7). La gran parte dei CRM sono *Matrix*-RM (B∩D), altrimenti si tratta di sostanze pure o miscele, impiegate per la taratura ((B∩C)-(B∩C∩D)) o per indagini di tipo qualitativo (B-(B∩D)-(B∩C)).

Le diverse tipologie di RM, le funzioni che questi possono assolvere durante il processo di misurazione e i parametri di scelta, sono stati approfonditamente esaminati in un recente lavoro (4), dove viene sottolineato che l'idoneità di un RM per un determinato scopo deve essere valutata caso per caso e che la qualità di un RM è strettamente connessa allo specifico impiego e alle condizioni di utilizzo. Ad esempio l'omogeneità va valutata in relazione alla dimensione dell'aliquota analitica e la scelta tra *Matrix*-RM o sostanza pura per la taratura va effettuata tenendo conto delle potenziali interferenze di matrice e del contributo all'incertezza finale. In linea generale infatti le sostanze pure possono essere certificate con un metodo primario – o attraverso misure direttamente riferibili al Sistema Internazionale SI durante il processo stesso di preparazione (8) – e quindi il loro utilizzo nella taratura comporta un minore contributo all'incertezza, rispetto all'impiego dei *Matrix*-CRM, la cui certificazione avviene nella maggior parte dei casi attraverso l'analisi statistica dei risultati di un interlaboratorio.

Controlli per l'individuazione e la determinazione quantitativa di micotossine si rendono necessari lungo l'intera filiera agroalimentare e zootecnica; essi devono riguardare sia la produzione primaria che i processi agro-industriali e devono essere condotti su alimenti, bevande e mangimi, a livello di materie prime, prodotti intermedi e finali. Considerando la molteplicità degli analiti e la varietà delle matrici per stato fisico e composizione, l'effettuazione di questi controlli richiede una grande disponibilità di RM. Estremamente utili si sono rivelate le tecniche *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e *Real Time*-PCR per l'individuazione precoce e la quantificazione di specie fungine (9). Solo da pochi anni si stanno affrontando le problematiche

per questo settore e recentemente sono state pubblicate dall'EU-JRC IRMM[1] guide specifiche sull'impiego di RM nei test genetici (10) e sull'incertezza di misura nei test per OGM (11).

Produzione attuale di RM per la determinazione di micotossine

Per esaminare la produzione mondiale di RM sono state prese in considerazione la banca dati internazionale COMAR (*COde d'Indexation des MAtériaux de Référence*) (12) realizzata in cooperazione tra alcuni Istituti Metrologici Nazionali e sostenuta da ISO-REMCO e la banca dati recentemente realizzata dal VIRM (*Virtual Institute for Reference Materials*) (13). La ricerca di specifici RM in queste banche dati risulta spesso non agevole. Le difficoltà derivano principalmente dal carattere generale di questi dataBase in quanto, considerando la produzione globale di RM/CRM per qualsiasi settore di attività, non prevedono l'utilizzo di criteri di ricerca ottimizzati per ciascun specifico settore. La banca dati COMAR consente una ricerca rigorosa delle sostanze chimiche certificate mediante nome o numero CAS, ma non permette ricerche per classi di sostanze chimiche, né consente ricerche incrociate analita/matrice. In considerazione delle difficoltà emerse nell'utilizzo di dataBase generali per gli RM, nel 2001 (14) è stata realizzata una banca dati specifica per il settore agroalimentare, che viene periodicamente aggiornata (15) consultando direttamente i cataloghi dei singoli produttori (IRMM[1], LGC[2], NIST[3], IAEA[4], MUVA[5], NRC-CNRC[6], RomerLabs®-Biopure[7], NMI-NARL[8], FAPAS®[9]), oltre che le seguenti banche dati disponibili online: COMAR, IAEA, *Japanese RMs search*, VIRM. Pertanto, per esaminare la produzione attuale di RM per la determinazione di micotossine, è stata utilizzata la banca dati sviluppata dell'ENEA, aggiornata al settembre 2009. Da un esame comparato degli RM per micotossine risultanti nelle banche dati COMAR, VIRM ed ENEA (Tabella 1) è possibile effettuare le seguenti osservazioni:

- la banca dati COMAR non prende in considerazione, oltre ai produttori di RM-*Quality Control* come il FAPAS®, il produttore di CRM RomerLabs®-Biopure;
- la banca dati del VIRM non prende in considerazione il produttore NARL e classifica come non-certificati i CRM RomerLabs®-Biopure.

Si evidenziano inoltre problematiche generali di aggiornamento a carico di COMAR e VIRM.

La produzione attuale di RM per la determinazione di micotossine nella filiera agroalimentare e zootecnica è di 137 CRM prodotti da IRMM (24 CRM), NARL (5 CRM) e RomerLabs®-Biopure (108 CRM), più 80 RM-*Quality Control* prodotti dal FAPAS®. Di questi 137 CRM, soltanto 21 sono *Matrix*-CRM, mentre i rimanenti 116 CRM sono sostanze per taratura in forma di: sostanze pure (21 CRM); soluzioni di sostanze pure in acetonitrile (48 CRM), acetonitrile/acqua (5 CRM) e cloroformio (1 CRM); soluzioni di sostanze pure *dried down* (22 CRM); soluzioni di sostanze pure marcate con isotopi stabili in acetonitrile (16 CRM) e acetonitrile/acqua (3 CRM).

---

[1] EU-JRC-IRMM – Institute for Reference Materials and Measurements - http://irmm.jrc.ec.europa.eu
[2] LGC – Laboratory of the Gorvernment Chemist (UK) - www.lgc.co.uk/
[3] NIST – National Institute of Standards and Technology (USA) - www.nist.gov
[4] IAEA – International Atomic Energy Agency (Austria) - www.iaea.org/
[5] MUVA Kempten (Germany) - www.muva.de
[6] NRC-CNRC – National Research Council Canada - www.nrc-cnrc.gc.ca
[7] RomerLabs®-Biopure (Austria) – www.romerlabs.com
[8] NMI-NARL – Australian National Measurement Institute - www.measurement.gov.au
[9] FAPAS® (UK) – The food and environment research agency - programma di controllo delle prestazioni sulle analisi degli alimenti – www.fapas.com

Tabella 1. Produzione di RM per micotossine riportata da diversi database

Database	IRMM	NARL	RomerLabs® Biopure	FAPAS®	Totale
COMAR	8 ST 16 *Matrix*-CRM	2 ST	–	–	10 ST 16 *Matrix*-CRM
VIRM	2 Sost. Taratura 13 *Matrix*-CRM*	–	33 ST	100 *Matrix*-RM(QC)*	35 ST 13 *Matrix*-CRM* 100*Matrix*-RM(QC)*
ENEA	8 ST 16 *Matrix*-CRM	5 ST	103 ST 5 *Matrix*-CRM	80 *Matrix*-RM(QC)	116 Sost.Taratura 21 *Matrix*-CRM 80 *Matrix*-RM (QC)

ST: sostanze di taratura; **QC**: Quality Control
*- vengono riportati anche RM fuori produzione

In Tabella 2 viene riportata la produzione di sostanze pure distinguendo tra le diverse classi di micotossine. Sostanze per taratura sono disponibili prevalentemente per Aflatossine, Zearalenoni e Tricoteceni, in forma di soluzioni, soluzioni marcate e sostanze pure. Il NARL produce unicamente sostanze pure per la determinazione di Zearalenoni (5 CRM); l'IRMM produce soluzioni di sostanze pure per la determinazione di Aflatossine (7 CRM), Zearalenoni (1 CRM) e Tricoteceni (2 CRM); la RomerLabs®-Biopure produce una grande varietà di sostanze per taratura nelle diverse forme per tutte le classi di micotossine, comprendendo anche gli Alcaloidi dell'Ergot (12 CRM), Alternarioli (3 CRM) e micotossine minori (20 CRM).

Tabella 2. Produzione di sostanze per taratura (RM) per le diverse classi di micotossine

RM	AF	FUM	OCRA	PAT	ZEA	TRI	ERGOT	ALT	MICOm
Sostanze pure	4 BIO	1 BIO	1 BIO	1 BIO	5 NARL 1 BIO	7 BIO	–	–	1 BIO
Soluzioni di sostanze pure									
semplici	7 IRMM 5 BIO	4 BIO	3 BIO	1 BIO	1 IRMM 8 BIO	2 IRMM 15 BIO	–	–	9 BIO
dried down	–	–	–	–	–	1 BIO	12 BIO	3 BIO	6 BIO
marcate	4BIO	3 BIO	1 BIO	1 BIO	1 BIO	5 BIO	–	–	4 BIO

AF: Aflatossine; **FUM**: Fumonisine; **OCRA**: Ocratossine; **PAT**: Patulina; **ZEA**: Zearalenoni; **TRI**: Tricoteceni;
ERGOT: alcaloidi dell'Ergot; **ALT**: Alternarioli; **MICOm**: Micotossine minori;
BIO: Biopure - RomerLabs®-Biopure (Austria)

Per quanto riguarda i *Matrix*-CRM, IRMM e RomerLabs®-Biopure producono CRM per la determinazione di micotossine in cereali (10 CRM), legumi (3 CRM), prodotti lattiero-caseari (3 CRM), oli e grassi animali e vegetali (3 CRM), mangimi (2 CRM). In particolare sono disponibili CRM di mais certificati per Deossinivalenolo (DON), Zearalenoni (ZEA), Fumonisine B_1 e B_2 (FB_1, FB_2); frumento certificato Ocratossina A (OTA) e DON; arachidi certificate per Aflatossine B_1, B_2 e G_1 (AFB_1, AFB_2, AFG_1); latte certificato per Aflatossina M_1 (AFM_1); burro di arachidi certificato per AFB_1, AFB_2, AFG_1 e AFG_2; mangime composto certificato per AFB_1, AFB_2, AFG_1.

In Tabella 3 si riporta un incrocio tra i valori soglia per il contenuto di micotossine stabiliti dalla normativa vigente per alimenti (16), alimenti per l'infanzia (17) e mangimi (18, 19) e la disponiblità di CRM. In particolare si evidenzia che, mentre la disponibilità attuale di sostanze

per taratura copre pressoché tutte le esigenze previste dalla normativa, sussiste una generale carenza di *Matrix*-CRM in considerazione delle specifiche esigenze di combinazione analita/matrice.

Tabella 3. Tabella di confronto tra la disponibilità di CRM (in matrice o sostanze pure) e l'esigenza normativa

Matrice	Aflatossine					Patulina	OTA	Fumonisine		ZEA	Tricoteceni			
	AFB$_1$	AF B$_2$	AF G$_1$	AF G$_2$	AFM$_1$			FB$_1$	FB$_2$		T-2	HT-2	DON	Altri
Alimenti per lattanti e prima infanzia														
Arachidi	3 - Burro di arachidi 1 - Farina di arachidi 2 - Farina di arachidi													
Frutta a guscio														
Cereali							1 - Farina di grano			1 - Farina di grano 2 - Farina di mais			2 - Farina di grano 2 - Farina di mais	
Spezie														
Latte					3 - Latte intero in polvere									
Mangimi	1 - Mangime composto 1 - Mangime composto													
Succhi, composte di frutta, ecc.														
Frutta secca														
Caffè														
Vino														
Pasta, pane, biscotti, ecc.														

Sostanze di taratura

	AFB$_1$	AF B$_2$	AF G$_1$	AF G$_2$	AFM$_1$	Patulina	OTA	FB$_1$	FB$_2$	ZEA	T-2	HT-2	DON	Altri
Soluzioni di sostanze pure *dried down*														1
Soluzioni di sostanze pure	2	2	2	2	2	1	2	1	1	3	1	1	1	12
Soluzioni di sostanze pure MIX	2							1		1				
													1	
Soluzioni di sostanze pure marcate	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	2
Sostanze pure	1	1	1	1		1	1	1		2	1		1	5

Reg. CE 683/2004   Reg. CE 1881/2006 s.m.i.   DL.vo. 149/2004, Racc. CE/17/08/2006

Impiego di RM nella determinazione di micotossine

Al fine di individuare le tipologie di RM da impiegare nelle diverse fasi del procedimento analitico, in Figura 2 si riporta una schematizzazione della procedura analitica, considerando sia le tecniche cromatografiche che quelle immunochimiche e campioni sia solidi (es. cereali, frutta secca, mangimi) che liquidi (es. latte, vino, birra).
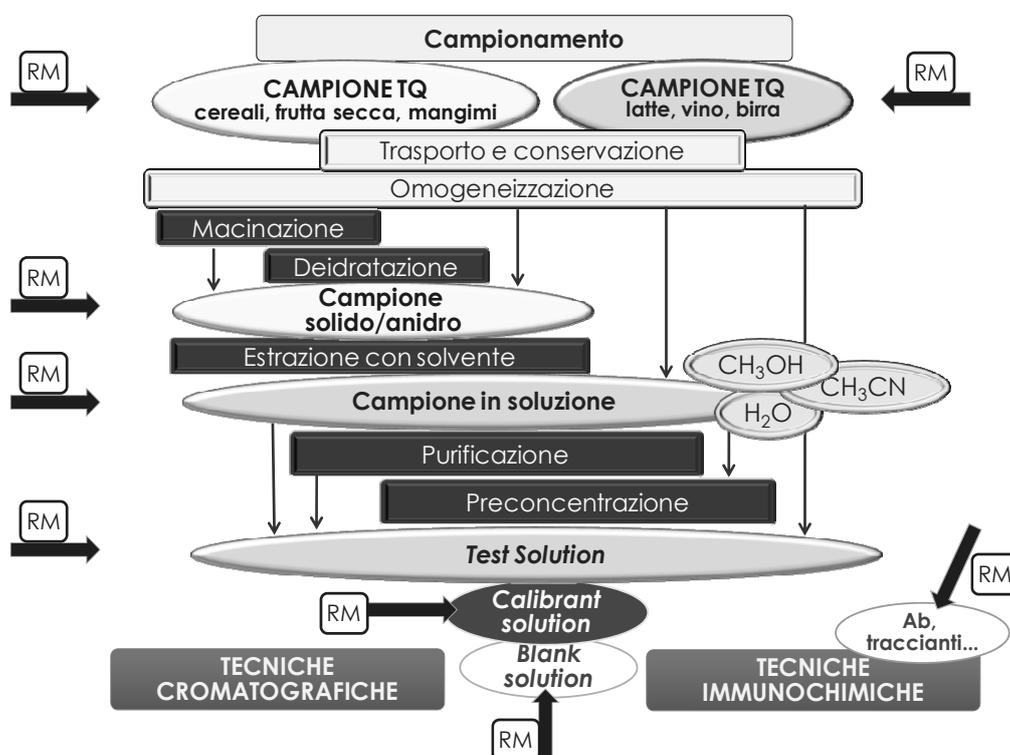
Figura 2. Schematizzazione della procedura analitica e impiego di RM nelle diverse fasi

La necessità di RM può riguardare sia le fasi di trasporto, conservazione e omogeneizzazione, sia quelle di pretrattamento (macinazione, deidratazione, purificazione e preconcentrazione), sia la fase analitica propriamente detta (taratura, controlli di purezza e specificità dei reagenti, controlli delle interferenze). Mentre per le prime fasi sarebbero necessari RM quanto più simili (in termini di composizione, stato fisico, omogeneità, ecc.) al campione TQ, nelle fasi successive possono essere convenientemente impiegati differenti RM con caratteristiche simili a quelle degli intermedi di lavorazione del campione, quali ad esempio i materiali macinati anidri. Per ragioni di natura tecnico-economica la produzione di *Matrix*-RM riguarda quasi totalmente i materiali deidratati e omogeneizzati; ciò comporta una limitazione nelle possibilità di impiego di questi RM in quanto possono essere controllate soltanto le fasi analitiche successive all'ottenimento di un campione stabile e omogeneo (20). La possibilità di realizzare e impiegare RM di prodotti agroalimentari TQ è strettamente legata alle caratteristiche di stabilità e omogeneità del prodotto. In linea generale ciò è fattibile più per i prodotti trasformati che per la produzione primaria, in quanto in questo secondo caso i prodotti presentano caratteristiche di stabilità tali da richiedere l'utilizzo di tecnologie onerose per la

conservazione e il trasporto e, considerando la ridotta omogeneità, implicano una considerevole dimensione (in termini di massa o volume) della singola unità di RM. Nella fase analitica propriamente detta vengono per lo più impiegate sostanze pure, per motivi di disponibilità e di minor contributo all'incertezza finale, anche se non sempre questa scelta viene preceduta da un controllo dell'occorrenza di interferenze e quasi mai viene considerato il contributo all'incertezza derivante da questo controllo (21).

Per valutare/verificare le prestazioni di alcune fasi intermedie, sarebbe utile disporre di RM appositamente sviluppati, quali ad esempio:

- estratti preparati a partire da prodotti agroalimentari in condizioni analoghe a quelle impiegate nella procedura analitica, ripartiti in aliquote omogenee e certificati per il/i contenuto/i di micotossine da impiegare per la taratura e per il controllo delle interferenze
- prodotti agroalimentari con certificata assenza di contaminazione (prodotti naturali o opportunamente purificati), da utilizzare per controlli di processo e per la realizzazione di *spiked*-RM (con contenuto di micotossine certificato attraverso il processo di preparazione) da impiegare per la taratura e la verifica di interferenze.

Per quanto riguarda i metodi immunochimici, questi possono avvalersi, per le fasi procedurali in comune con i metodi cromatografici, della maggior parte dei *Matrix*-RM esistenti, così come possono utilizzare per la taratura le stesse sostanze pure. Questo settore necessità però di ulteriori RM per controllare alcuni specifici parametri influenti sulla qualità delle misure e in primo luogo sull'accuratezza dei risultati, quali ad esempio purezza, specificità e grado di affinità degli immunoreagenti o purezza e attività dei traccianti enzimatici.

Facilities ENEA per la preparazione di nuovi RM

Nell'ambito di diversi progetti nazionali e comunitari sono stati realizzati presso i centri di ricerca Trisaia e Casaccia dell'ENEA impianti dedicati alla preparazione di Materiali di Riferimento (22), realizzati in accordo alle indicazioni ISO-REMCO (23). L'impianto del C.R. Trisaia è specificatamente dedicato al settore agroalimentare; esso risulta costituito da tre linee per la preparazione di Materiali di Riferimento liofilizzati, di Materiali di Riferimento liquidi e di suoli agricoli ed è dimensionato per lotti di 1000 unità. L'impianto della Casaccia è stato progettato per studi su scala pilota, per effettuare studi di fattibilità o per realizzare piccole produzioni (lotti fino a 100 unità) o *custom*-RM.

In Figura 3 si riporta il diagramma a blocchi della linea liofilizzati con un esempio applicativo relativo alla preparazione di un RM di fragole liofilizzate. È possibile ottenere RM con un elevatissimo grado di omogeneità grazie all'impiego di più fasi di omogeneizzazione sia a umido che a secco e alla fase di macinazione condotta sul materiale liofilizzato. La possibilità di effettuare un deidratazione sotto vuoto finale del materiale già imbottigliato consente di ottenere RM con bassi valori di acqua libera ($a_w \leq 0,2$), a vantaggio della stabilità dei prodotti. Considerando l'alta igroscopicità dei liofilizzati, tutte le operazioni da effettuare su materiali anidri (omogeneizzazione a secco, setacciatura, macinazione, imbottigliamento) sono raggruppate in aree dedicate ed è possibile anche utilizzare una cabina mobile da posizionare sulle specifiche apparecchiature per operare sotto gas inerte.

L'impianto è dotato di un liofilizzatore a ripiani, con programmazione dei cicli termici e controllo della pressione, accessoriato con sistema di *stoppering* automatico che consente la chiusura dei flaconi sottovuoto o in atmosfera inerte. L'omogeneizzazione dei materiali umidi viene effettuata mediante l'impiego di un miscelatore a pale e può essere conseguita anche attraverso l'impiego dell'evaporatore rotante industriale (V = 100 L) di cui è dotato l'impianto.
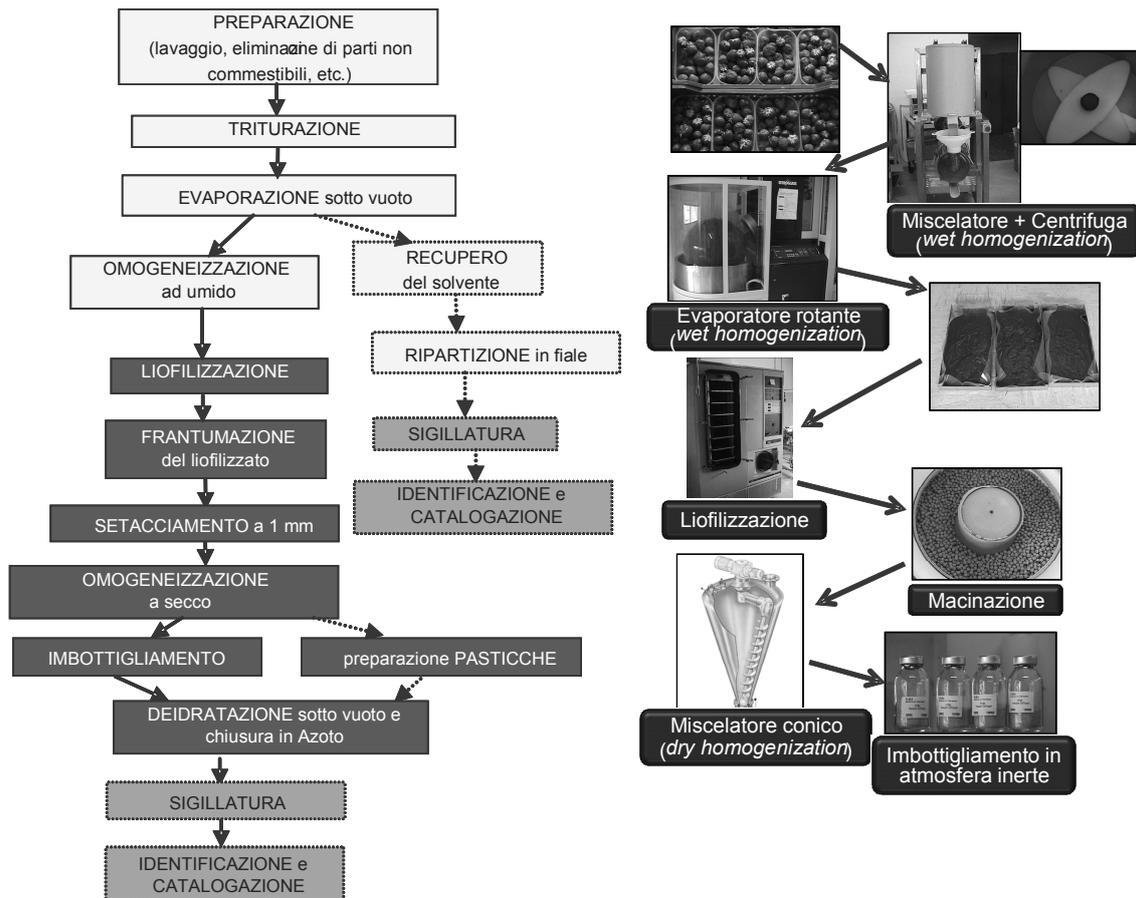
Figura 3. Diagramma a blocchi della linea di preparazione di liofilizzati dell'impianto Materiali di Riferimento ENEA con esempio di realizzazione di un RM di fragole liofilizzate

Detto evaporatore, equipaggiato con una sonda di temperatura interna al pallone e un gruppo refrigerante ausiliario (fino a -40°C), viene impiegato per effettuare una prima estrazione dell'acqua (e/o degli alcoli eventualmente presenti) – a bassa pressione e bassa temperatura – prima della fase di liofilizzazione. Ciò rappresenta una novità assoluta nelle procedure di preparazione di Materiali di Riferimento e consente di: ridurre il numero dei cicli di liofilizzazione con conseguente abbattimento dei consumi energetici e dei tempi esecutivi; migliorare l'efficacia del processo di liofilizzazione; di condurre una omogeneizzazione ad umido del materiale; recuperare l'estratto contenente, oltre l'acqua (o miscele idroalcoliche), le eventuali sostanze volatili condensate. L'omogeneizzazione a secco può essere effettuata attraverso l'impiego di miscelatori conici VRIECO-NAUTA® (volumi disponibili: 5, 10 e 240 L) o con un sistema di rotazione su due assi (planetario) che consente di evitare travasi di materiale, in quanto può operare con contenitori commerciali di diversi volumi e materiali. Per la macinazione dei materiali l'impianto è dotato di diversi sistemi con parti a contatto inerti o anti-contaminazione, che consentono la lavorazione di materiali di diverse caratteristiche meccaniche (durezza, friabilità, ecc.). Altri componenti dell'impianto sono: sistemi per il setacciamento dei materiali, sistemi per la ripartizione e l'imbottigliamento di liquidi o solidi, un apparato semiautomatico per la sigillatura delle fiale in vetro e una pasticcatrice automatica.

Presso il Centro Ricerche Casaccia sono stati realizzati laboratori per condurre le prove di stabilità (sotto stress termico e luminoso), di omogeneità e di caratterizzazione chimica e chimico-fisica dei Matrix-RM ed è in corso di allestimento un laboratorio di metrologia chimica per la realizzazione di Calibrant-RM. Le *facilities* di irraggiamento presenti in Casaccia (reattore Triga e impianto Calliope) consentono l'impiego della tecnica di Analisi per Attivazione Neutronica (INAA) per gli studi di omogeneità, stabilità e caratterizzazione degli RM e per la sterilizzazione degli RM mediante raggi γ. Gli impianti realizzati, in considerazione dei materiali costruttivi, delle tecnologie e delle procedure impiegate, consentono di ottenere RM con caratteristiche d'eccellenza in termini di omogeneità e stabilità chimica e microbiologica. Gli impianti possiedono inoltre caratteristiche di unicità e introducono elementi di innovazione nella preparazione degli RM, quali, ad esempio, la possibilità di preparare *Double-Phase*-RM (*DP*-RM) e RM monouso.

Con gli impianti descritti sono stati realizzati diversi Materiali di Riferimento di interesse per il settore agroalimentare tra cui diversi prodotti alimentari liofilizzati (22,24) (funghi champignons, pomodori freschi e pelati in latta, fragole e broccolo) e un mangime per pesci (25). Nell'ambito di una collaborazione con il Laboratorio Comunitario di Riferimento per gli elementi chimici negli alimenti di origine animale presso l'ISS (CRL-ISS) sono stati preparati diversi RM liofilizzati (muscolo e fegato bovino, carne suina, latte, pesce) da impiegare nei circuiti interlaboratorio internazionali (26, 27, 28).

Nell'ambito delle attività riguardanti la qualità delle misure per la sicurezza degli ambienti di lavoro è stato recentemente condotto uno studio di fattibilità per la realizzazione di un RM di *toner* "a più dimensioni", ossia un RM da certificare per valori di proprietà chimiche (composizione chimica e/o contenuto di sostanze tossiche) e da accompagnare con valori di riferimento e/o di informazione per proprietà fisiche, chimico-fisiche e tossicologiche (29). L'utilizzo di questa nuova tipologia di RM potrebbe apportare notevoli vantaggi anche per il settore della sicurezza alimentare con particolare riguardo alla specifica problematica delle micotossine e pertanto sono in via di definizione studi di fattibilità anche per questo settore.

Bibliografia

1. ISO-REMCO GUIDE 30:1992/Amd.2008. *Terms and definitions used in connection with reference materials*. Geneva: International Organization for Standardization; 1992-2008.
2. JCGM 200:2008. *International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms. VIM*. 3rd ed. Sèvres Cedex: Bureau International des Poids et Measures; 2008.
3. Emons H. The "RM family" – Identification of all its members. *Accreditation and Quality Assurance* 2006;10:690-1.
4. Gatti R, Sangiorgio P, Zappa G, Zoani C. Scelta e utilizzo dei materiali di riferimento per la qualità delle misure chimiche. In: A*tti del VI Mostra Congresso "Metrologia & Qualità", Torino, 7-9 aprile 2009*.
5. European Co-operation for Accreditation. *The selection and use of reference materials*. Paris: European Co-operation for Accreditation; 2003. (EA Guide 04/14 2003).
6. ISO-REMCO GUIDE 31:2000(E). *Reference materials - Contents of certificates and labels.* Geneva: International Organization for Standardization, Second edition, 2000.
7. Emons H. The use of reference materials in international reference measurement systems and for comparison of analytical data. In: Fajeli A, Belli M, U. Sansone U (Ed.). *Combining and reporting analytical results*. London: RSC publishing 2007, p. 205-15.

8. Gatti R, Sangiorgio P, Zappa G, Zoani C. Some considerations on certification of monoelemental Reference Solutions. In: *Atti del Workshop "Traceability to support CIPM MRA and other international arrangements", Torino (Italy), 6-7 November 2008*.
9. Niessen L. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology* 2007;119:38-46.
10. Gancberg D, Corbisier P, Schimmel H, Emons H. *Guidance document on the use of reference materials on genetic testing*. Luxembourg: European Communities; 2008. (EUR 23256 EN- 2008).
11. Trapman S, Burns M, Broll H, Machartur R, Wood R, Zel J. *Guidance document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories*. Luxembourg: European Communities; 2009. (EUR 22756 EN2- 2009).
12. COMAR. *International database for certified reference materials*. Disponibile all'indirizzo: www.comar.bam.de; ultima consultazione 14/9/10.
13. VIRM. *Reference Material database*. Disponibile all'indirizzo: www.virm.net; ultima consultazione 14/9/10.
14. Del Monte MG, Troisi L, Zappa G. *Reference materials for agrofood*. Roma: Rapporto tecnico ENEA n.7/INN – 2000.
15. Carconi P, Gatti R, Zappa G, Zoani C. I materiali di riferimento per il settore agroalimentare: stato attuale e necessità. In: *Atti del V Congresso "Metrologia & Qualità", Torino, 14-16 marzo 2007*.
16. Unione Europea. Regolamento CE 683/2004 della Commisione del 13 aprile 2004 che modifica il regolamento CE n. 446/2001 per quanto riguarda le aflatossine e l'ocratossina A negli alimenti per lattanti e prima infanzia. *GUCE* L 106, 15 aprile 2004.
17. Unione Europea. Regolamento (CE) n.1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *GUCE* L 364, 20 dicembre 2006.
18. Italia. Decreto legislativo 149/2004. Attuazione delle direttive 2001/102/CE, 2002/32/CE, 2003/57/CE e 2003/100/CE, relative alle sostanze e ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali. *Gazzetta Ufficiale* n. 139, 16 giugno 2004
19. Unione Europea. Raccomandazione CE 17/08/2006. Presenza di Deossinivalenolo, Zearalenone, Ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e Fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali. *GUCE* L 229, 23 agosto 2006.
20. Carconi P, Gatti R, Zappa G, Zoani C. A systematic approach in the evaluation of uncertainty in analytical chemistry – application to ICP-AES analysis. In: Fajeli A, Belli M, Sansone U (Ed.). *Combining and reporting analytical results*. London: RSC publishing; 2007. p. 161-7.
21. Carconi P, Gatti R, Zappa G, Zoani C. L'incertezza delle misure chimiche per la qualità e la sicurezza dei prodotti alimentari: individuazione delle fonti e applicazione delle procedure di calcolo. In: *Atti del V Congresso "Metrologia & Qualità", Torino, 14-16 marzo 2007*.
22. Adriani A, Amico A, Carconi P, Gatti R, Palazzo S, Portaro N, Sangiorgio P, Troisi L, Zappa G. *Preparazione di materiali di riferimento agroalimentari. Primi risultati e valutazioni.* Roma: ENEA; 2004. (RT/2004/22/BIOTEC).
23. ISO-REMCO Guide 34:2000 *General requirements for the competence of reference material producers*. Geneva: International Organization for Standardization, Second edition, 2000 (Cor 1:2003.).
24. Gatti R, Zappa G, Zoani C.Preparazione di un materiale di riferimento da utilizzare per misure del contenuto di sostanze nutriceutiche in prodotti alimentari. In: *Atti del V Congresso "Metrologia & Qualità", Torino, 14-16 marzo 2007*.

25. Diletti G, Scortichini G, Gatti R, Zappa G, Zoani C. Preparazione di un materiale di riferimento per l'analisi di PCDDs e PCDFs negli alimenti zootecnici. In: *Atti del V Congresso "Metrologia & Qualità", Torino, 14-16 marzo 2007*.
26. Senofonte O, Giordano R, Ciaralli L, Ciprotti M, Pino A, D'Amato M, di Gregorio M, Costantini S. Carconi P, Gatti R, Palazzo S, Zappa G, Zoani C. Preparazione di materiali di riferimento e loro utilità nei circuiti interlaboratorio per i Laboratori Nazionali di Riferimento della UE. In: *Atti del V Congresso "Metrologia & Qualità", Torino, 14-16 marzo 2007.*
27. Carconi P, Gatti R, Zappa G, Zoani C, Costantini S, Senofonte O. ENEA resources for Reference Materials production to support food quality and safety. Co-operation with the Community Reference Laboratory for chemical elements in food of animal origin (CRL-ISS). In: *Proceedings of the Scientific Symposium EFSA - University of Parma Food Safety and Quality, Nutrition and Nano-Technology - Parma 4 ottobre 2007*.
28. Ciaralli L, Giordano R, Senofonte O, Colabucci A, D'Amato M, D'Ilio S, Zappa G, Palazzo S, Di Gregorio M, Costantini S. Experiences of the Community Reference Laboratory for chemical elements in food of animal origin in the preparation of test materials for proficiency testing. In: Brookman B, Menditto A, Patriarca M (Ed.). *6th Workshop. Proficiency Testing in Analytical Chemistry, Microbiology and Laboratory Medicine: Current Practice and Future Directions. Rome, Italy, October 5-7, 2008. Abstract book.* Roma: Istiuto Superiore di Sanità; 2008 (ISTISAN Congressi 08/C8). p. 29-30.
29. Zappa G, Carconi P, D'Alessio A, Di Bonito R, Gatti R, Mosiello L, Zoani C. Feasibility study for the development of a toner-Reference Material*. Measurement* 2009;42:1491-6.

RAPIDO RILEVAMENTO DI FUNGHI TOSSIGENI IN CARIOSSIDI DI *ZEA MAYS* ATTRAVERSO LA SPETTROSCOPIA DI IMMAGINE

Antonella Del Fiore (a), Massimo Reverberi (b), Patrizia De Rossi (a), Valentina Tolaini (b), Alessandra Ricelli (c), Anna Adele Fabbri (b), Corrado Fanelli (b)
(a) Dipartimento Biotecnologie, Agroindustria e Protezione della Salute, Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile (ENEA), Centro Ricerche Casaccia Roma,
(b) Dipartimento di Biologia Vegetale, Università "Sapienza", Roma
(c) Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Centro Nazionale delle Ricerche, Bari

Introduzione

Le contaminazioni fungine rappresentano un grave problema per la filiera cerealicola. Alcune specie fungine, quali *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium* spp, e *Aspergillus niger*, possono produrre infatti, in idonee condizioni ambientali, micotossine, metaboliti secondari tossici per l'uomo e gli animali (1, 2). Molti metodi sono stati utilizzati per misurare la contaminazione da funghi tossigeni e la presenza di tossine nei cereali; Recentemente una particolare attenzione è stata rivolta a metodi basati sull'applicazione di tecniche analitiche non distruttive.

Obiettivo di questo lavoro è la realizzazione di un metodo analitico non distruttivo, basato sulla spettroscopia di immagine, per la rilevazione della contaminazione da funghi potenzialmente tossigeni (*A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. niger*) su cariossidi di mais. La spettroscopia di immagine è una tecnica analitica non distruttiva, pertanto particolarmente indicata per la la caratterizzazione e l'analisi di campioni biologici, che consente di caratterizzare un campione sia rispetto alle sue proprietà spettrali che a quelle superficiali, producendo una completa informazione spettrale (in termini di riflettanza, trasmittanza o assorbanza) per ciascun punto dell'immagine acquisita da esso, ad una specifica lunghezza d'onda.

Materiali e metodi

Le prove di analisi spettroscopica sono stati condotte con differenti ceppi fungini tossigeni e differenti ibridi commerciali di mais.

Ceppi fungini e condizioni colturali

Per le prove sono stati impiegati ceppi fungini commerciali, della collezione del Prof. C. Fanelli dell'Università "Sapienza" di Roma (*Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, *Aspergillus parasiticus* NRRL 11096, *Aspergillus niger, Penicillium expansum*), ceppi cortesemente forniti dalla North Carolina State University, Raleigh, USA (*Aspergillus flavus* NRRL 3357), e dall'Università di Sassari (*Fusarium verticilloides* e *Fusarium graminearum*). Sono stati utilizzati anche ceppi fungini isolati dai campioni di mais analizzati durante lo svolgimento della attività di ricerca in oggetto.

Ibridi di mais

Gli ibridi di mais (*Zea mays* L.) utilizzati nelle prove sperimentali (DK 537, Latina, Cecilia, Arsano, DKC 6843, Costanza), sono stati cortesemente forniti dall'Istituto Sperimentale di Cerealicoltura di Roma. Le analisi spettrali su mais contaminato artificialmente con le specie fungine di interesse analitico sono state eseguite sulla cultivar Cecilia. Per favorire lo sviluppo fungino i campioni di mais sono stati umidificati al 30% per aggiunta di acqua distillata.

Sistema per la spettroscopia d'immagine

Nei nostri esperimenti. è stato utilizzato un *Desktop Spectral Scanner* basato su uno Spettrometro di Immagine 'ImSpector V10' prodotto dalla SpecImTM, operante nell'intervallo spettrale visibile-vicino infrarosso (400-1000 nm), e su un software per l'elaborazione dei dati spettrali (Spectral Scanner v. 2.0 DV srl, 2003). Le analisi spettrali sui funghi tossigeni e sul mais sono state condotte in condizioni di riflettanza, misurando cioè l'intensità della luce riflessa dal campione sottoposto ad analisi rispetto all'intensità della luce incidente su di esso.

Risultati e discussione

Acquisizione delle immagini spettrali da mais non contaminato

Ibridi di mais differenti presentano profili spettrali sovrapponibili nella regione spettrale del Vicino Infrarosso (850-950 nm) mentre nella regione del visibile (500-700 nm) mostrano profili spettrali che possono differire in maniera anche significativa (ANOVA -*Fisher's LSD test*, in funzione della colorazione delle cariossidi). La Figura 1 riporta a titolo di esempio lo spettro di fiflettanza di cariossidi dell'ibrido di mais Cecilia.
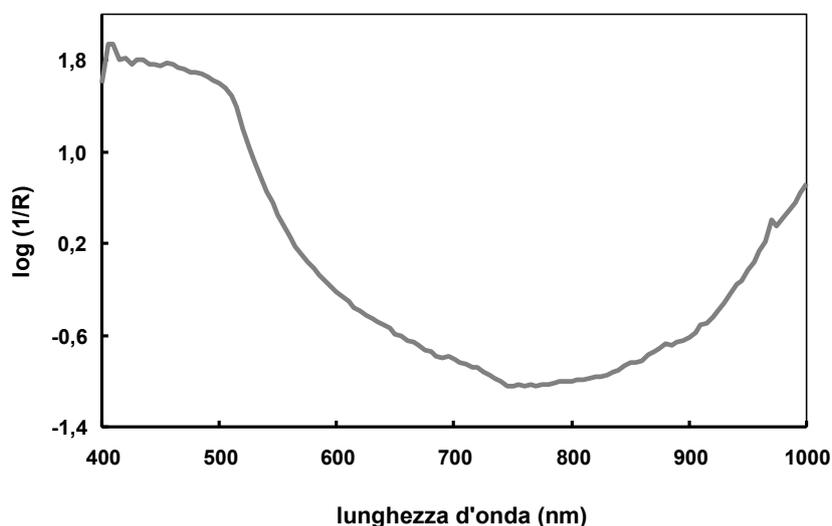
Figura 1. Spettro di riflettanza di cariossidi di ibrido di mais Cecilia non contaminato (dati espressi in unità di assorbanza apparente: log (1/R). I valori di assorbanza sono normalizzati rispetto alla media e alla deviazione standard. Per l'acquisizione spettrale le cariossidi sono state poste in piastre Petri (9 cm diametro)

Acquisizione delle immagini spettrali di specie fungine contaminanti del mais

L'analisi spettrale eseguita su colonie di diverse specie fungine (*Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus, Aspergillus niger, Fusarium graminearum* e *Fusarium verticilloides*), sia commerciali, che isolate da mais, derivanti da colture pure su terreno sintetico agarizzato, ha evidenziato caratteristiche spettrali differenti tra le specie testate, che hanno consentito di attribuire a ciascuna di esse un caratteristico profilo spettrale (firma spettrale). In Figura 2 viene mostrato, per ciascuna delle specie testate, lo spettro ottenuto dopo 7 giorni di crescita a 30°C.
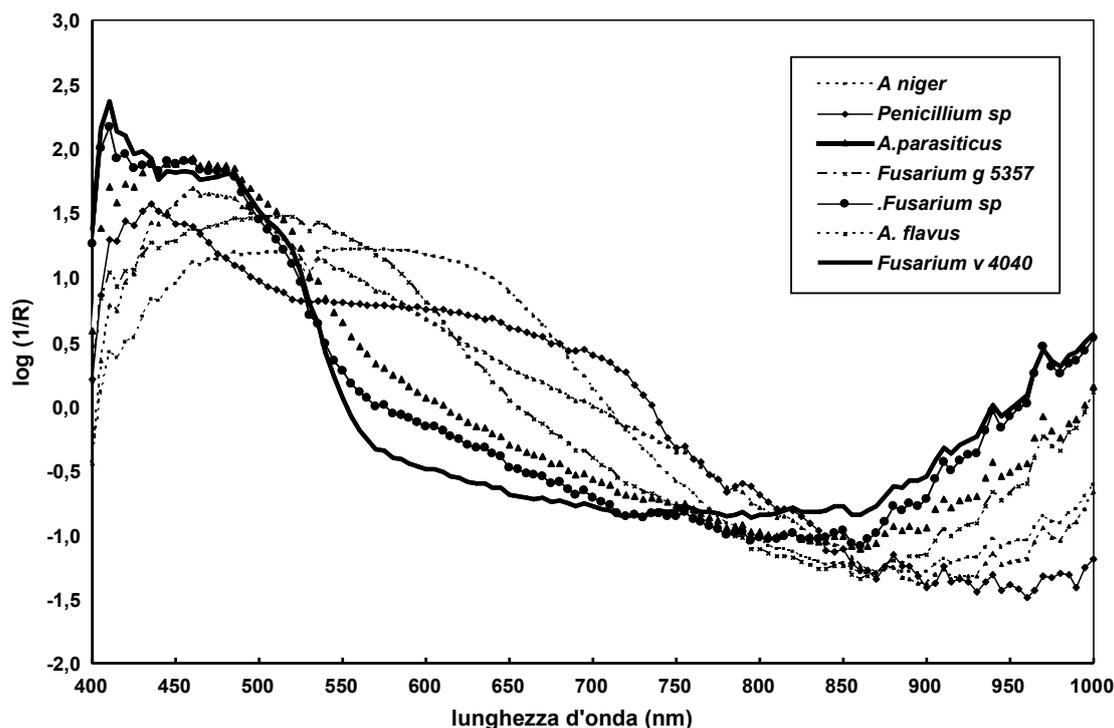
Figura 2. Spettri di riflettanza da inoculi su *Potato Dextrose Agar Plate* (PDA) di specie fungine naturali contaminanti del mais

Analisi delle variazioni spettrali determinate dallo sviluppo fungino sulla superficie del mais

Al fine di valutare le variazioni delle proprietà di riflettanza spettrale della superficie del mais determinate dallo sviluppo fungino, sono state eseguite prove di acquisizione di spettri di mais contaminato artificialmente, in condizioni di inoculo controllato, con le specie fungine di interesse analitico.

Sospensioni conidiche dei singoli funghi (*Aspergillus niger*, *Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus 3357*, *Aspergillus parasiticus 2999*) sono state a tale scopo inoculate su mais umidificato al 30% (10^4 conidi/g mais). L'acquisizione spettrale dei campioni è stata realizzata giornalmente, in un intervallo temporale di 7 giorni, nelle medesime condizioni operative per tutti i campioni, seguendo l'evoluzione dello sviluppo del micelio fungino sul mais (Figura 3).
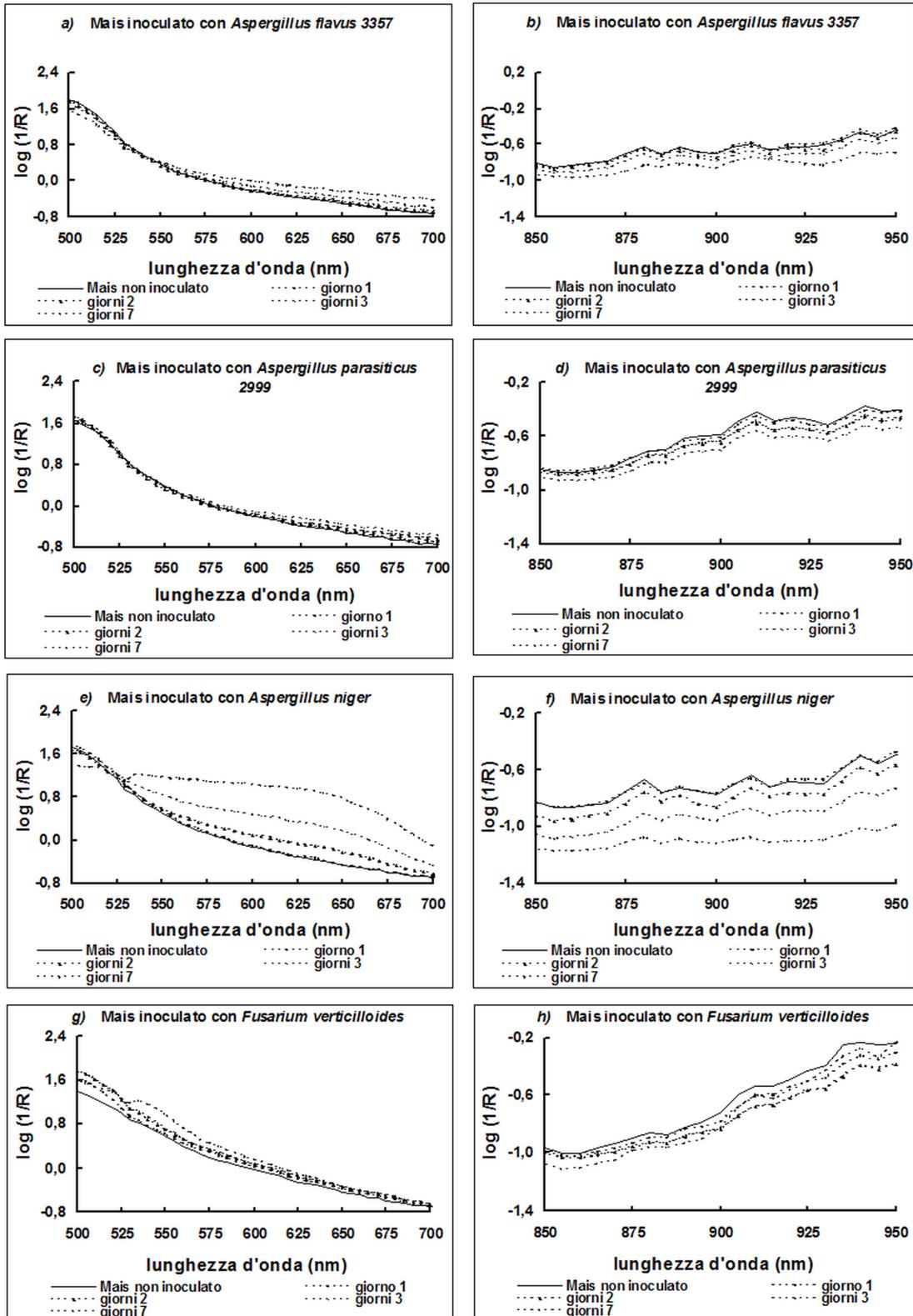
Figura 3. Spettri medi di riflettanza di cariossidi di mais (ibrido *Cecilia*) inoculate con sospensioni conidiche di singole specie fungine, dopo 1, 2, 3 e 7 giorni dall'inoculo

L'analisi degli spettri dei campioni di mais inoculato ha permesso di individuare due intervalli di lunghezza d'onda, 500-700 nm e 850-950 nm (3) nell'ambito dei quali è possibile monitorare, in maniera significativa le variazioni delle proprietà di riflettanza del mais contaminato. Nel primo intervallo (500-700 nm) l'assorbanza apparente (log 1/R) del mais è maggiore per tutti i campioni contaminati rispetto a quelli non contaminati e aumenta all'aumentare del grado di contaminazione delle cariossidi (Figura 3a, 3c, 3e, 3g). Nel secondo intervallo (850-950 nm), l'assorbanza apparente del mais è al contrario più bassa in tutti i campioni contaminati rispetto a quelli non contaminati e diminuisce all'aumentare del grado di contaminazione delle cariossidi (Figure 3b, 3d, 3f, 3h).

Le variazioni spettrali riscontrate, nell'intervallo spettrale saggiato, tra i campioni inoculati e il controllo non inoculato, sono maggiori in mais contaminato con *Aspergillus niger* rispetto a quello contaminato con *Aspergillus flavus* o *Aspergillus parasiticus* (Figura 4).
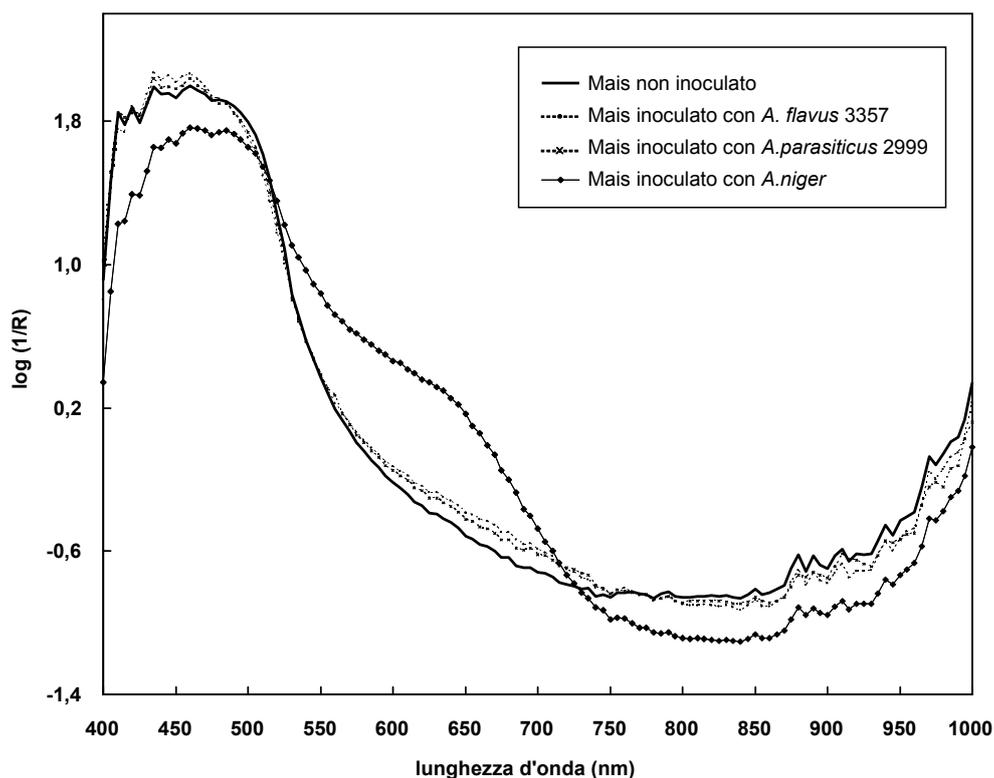
Figura 4. Spettri medi di riflettanza di mais (ibrido *Cecilia*) inoculato con sospensioni conidiche di colture pure di differenti specie fungine (spettri registrati a 3 giorni dall'inoculo delle sospensioni conidiche su mais umidificato al 30%)

L'analisi della varianza (ANOVA-Q1/Fisher LSD) operata su due lunghezze d'onda (410 nm e 470 nm), selezionate attraverso analisi delle componenti principali e analisi discriminante sui dati spettrali globali, ha permesso di verificare che il sistema analitico testato presenta capacità discriminante statisticamente significativa (ad un livello di confidenza del 95%), tra il mais non contaminato e il mais contaminato con *Aspergillus flavus* a partire dalle 48 h di incubazione (Tabelle 1, 2), quando la contaminazione fungina non è ancora percepibile ad osservazione visiva.

Tabella 1. ANOVA-Q1/Fisher (LSD): mais inoculato con una sospensione conidica di *Aspergillus flavus* 3357 e incubato in termostato a 30°C, per 10 giorni. Lunghezza d'onda: 410 nm

Contrasto	Differenza	Differenza standardizzata	*Critical value*	p > Diff	Significativo
non inoculato *vs* 1giorno	0,083	1,464	2,014	0,150	NO
non inoculato *vs* 2 giorni	0,161	2,844	2,014	0,007	SÌ
non inoculato *vs* 3 giorni	0,168	2,962	2,014	0,005	SÌ
non inoculato *vs* 4 giorni	0,154	2,719	2,014	0,009	SÌ
non inoculato *vs* 10 giorni	0,213	3,755	2,014	0,000	SÌ

Tabella 2. ANOVA-Q1/Fisher (LSD): mais inoculato con una sospensione conidica di *Aspergillus flavus* 3357 e incubato in termostato a 30°C, per 10 giorni. Lunghezza d'onda: 470 nm

Contrasto	Differenza	Differenza standardizzata	*Critical value*	p > Diff	Significativo
1 giorno *vs* non inoculato	0,026	1,137	2,014	0,261	NO
2 giorni *vs* non inoculato	0,077	3,427	2,014	0,001	SÌ
3 giorni *vs* non inoculato	0,068	3,049	2,014	0,004	SÌ
4 giorni *vs* non inoculato	0,079	3,504	2,014	0,001	SÌ
10 giorni *vs* non inoculato	0,063	2,789	2,014	0,008	SÌ

Conclusioni

I risultati ottenuti indicano che la spettroscopia di immagine permette in primo luogo di discriminare tra differenti specie fungine, producendo per ciascuna di esse uno specifico profilo spettrale, la cosiddetta "firma spettrale". Questa importante proprietà può essere sfruttata per effettuare il riconoscimento di diverse specie fungine attraverso il confronto con standard spettrali di funghi noti.

La metodica analitica basata sulla spettroscopia d'immagine presentata in questo studio è stata sviluppata su mais contaminati in laboratorio con specie fungine commerciali e con specie fungine isolate dal mais stesso, e poi verificata su campioni naturalmente contaminati. Essa ha consentito una precoce rilevazione dei contaminanti fungini sul mais, riuscendo a discriminare precocemente i campioni di mais non contaminati da quelli contaminati, sulla base delle variazioni prodotte dalla contaminazione fungina nel profilo spettrale del mais.

La variabilità dei dati delle serie di spettri ottenuti da tutti i campioni di mais inoculato e non, è stata confrontata utilizzando l'analisi delle componenti principali (*Principle Component Analysis*, PCA). I risultati delle analisi sono stati successivamente utilizzati per creare un modello per la identificazione della crescita fungina attraverso l'analisi discriminante o l'Analisi ANOVA sulle componenti principali individuate. I risultati mostrano che l'analisi spettrale associata a quella statistica permette di individuare rapidamente e precocemente la contaminazione con funghi potenzialmente tossigeni sulla base delle variazioni delle proprietà di riflettanza spettrale del mais.

Tale metodo si dimostra efficace quando i metodi tradizionali non lo sono ancora e cioè 48 ore dopo l'inoculo con *Aspergillus flavus* o *Aspergillus niger*.

Lo sviluppo di sistemi di Imaging spettrale portatili o automatizzati renderebbe infine possibile l'impiego della tecnica analitica presentata per rapide determinazioni *in situ* o online.

Bibliografia

1. Fanelli C, Ricelli A, Reverberi M, Fabbri AA. Aflatoxins and ochratoxins in cereal grains: an open challenge". In: Pandalai SG (Ed.). *Recent research development in crop science*. vol. 1. Kerala, India Research Signpost; 2004. p. 295-317.
2. Naceur Haouet M, Altissimi MS. *Webzine-Sanità pubblica veterinaria* 2003:3(18).
3. Pearson TC, Wicklow DT. Detection of corn kernels infected by fungi. *Transactions of the ASABE* 2006;49:1235-45

VALIDAZIONE SECONDO LA DECISIONE 657/2002/CE DI UN METODO DI SCREENING IN IMMUNOENZIMATICA PER LA DETERMINAZIONE DI ZEARALENONE NELL'ALIMENTAZIONE UMANA

Rita De Pace, Valeria Vita
Dipartimento Chimica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia-Basilicata, Foggia

Introduzione

Le micotossine sono metaboliti secondari di microscopici funghi, tossici per gli animali superiori, con un peso molecolare relativamente basso, moderata o alta volatilità, alta stabilità e una struttura specifica racchiusa nella tassonomia dei microorganismi produttori.

Questi metaboliti che variano enormemente nella loro struttura chimica, mostrano un considerevole intervallo di effetti biologici dovuti alla loro abilità di interazione con vari organismi e/o sistemi bersaglio.

La contaminazione da micotossine nell'uomo avviene mediante passaggio da vegetali contaminati o da prodotti alimentari. Oltre a problemi di salute, la contaminazione di prodotti alimentari può causare grandi perdite economiche a causa della ridotta produttività degli animali nutriti con mangimi che contengono anche solo piccole concentrazioni di micotossine.

Lo Zearalenone (ZEA) è una micotossina prodotta da almeno otto specie tossigene del genere *Fusarium*, incluse *F. Graminearium, F. Culmorum* e *F. Equiseti*, che colonizzano i cereali, dove trovano eccellenti condizioni per la sintesi di micotossine. Guardando la struttura chimica, lo ZEA è un lattone dell'acido resorcinolico, in grado di combinarsi con recettori estrogenici, producendo una risposta estrogeno-affine.

Per questa ragione lo ZEA, oltre ad avere una specifica e acuta tossicità, agisce come sostituto del 17-ß-estradiolo, legandosi ai suoi recettori. Di conseguenza esso si può considerare come una sostanza ormonale che esibisce attività anabolica e utertropica.

Uno studio italiano condotto dalla clinica pediatrica dell'università di Pisa, in collaborazione con la Facoltà di Medicina Veterinaria rivela un aumento di casi di pubertà precoce nelle bambine nel Nord-Ovest della Toscana probabilmente legati a tossine rilasciate nell'ambiente da muffe del genere Fusarium tra cui la micotossina ad azione estrogenica ZEA.

Lo ZEA è stato classificato dallo *International Agency for Research on Cancer* (IARC) come cancerogeno di categoria 3 per l'inconsistenza della sperimentazione disponibile. Possiamo dire comunque che in generale questa micotossina è epatotossica, ematotossica, immunotossica e genotossica.

Recentemente è stato approvato da parte del Ministero della Salute con nota prot. 0001664-P-02/04/2009 DSVET il Piano vegetali presentato dagli IZS in attuazione del DM 27 Febbraio 2008 che trasferisce queste competenze ai suddetti Istituti.

Materiali e metodi

Preparazione dei campioni

Le specie di mangimi testate sono 6 campioni di grano duro, 6 campioni di grano tenero, 4 di avena e 4 di orzo.

La procedura di preparazione del campione prevede le seguenti fasi:

- macinare finemente il campione da testare;
- pesare 5 g del campione macinato in una falcon da 50 mL;
- addizionare 25 mL di metanolo al 70% in acqua deionizzata;
- estrarre per 3 minuti agitando manualmente;
- filtrare il campione con carta Whatman 1 e raccogliere il filtrato;
- diluire il filtrato 1:2 (1 + 1) con metanolo al 70%
- diluire la soluzione precedente 1:7 (1 + 6) con il tampone di diluizione e procedere all'esecuzione del kit.

Procedura analitica

Le analisi sono state effettuate in doppio per ogni singolo campione utilizzando un metodo immunoenzimatico (ELISA) e nello specifico un kit dell'R-biopharm, con le seguenti specifiche:

- limite di quantificazione (*Limit of Quantification*, LOQ) = 50 ng/kg;
- *cross*-reattività: ZEA 100%; a-ZEA 41,6%;
- soluzioni standard: 0, 50, 150, 450, 1350, 4050 ng/kg.

Il recupero medio ottenuto durante le prove di validazione è stato del 86%.

Per il kit sono state studiate le seguenti prestazioni:

- specificità;
- verifica dell'errore ß;
- robustezza;
- precisione.

Risultati

Le prove per la verifica della specificità e dell'errore β (<5%) sono state condotte parallelamente, infatti, a ciascun bianco-campione è stato associato il suo fortificato al livello di interesse nella stessa seduta analitica.

Pertanto, sono stati testati 20 bianchi-campione rappresentativi e i relativi fortificati a 100 µg/kg. con ZEA.

Dato l'elevato numero di prove sono state eseguite 2 sedute analitiche. I dati sono riassunti in Tabella 1.

Tabella 1. Specificità del kit ELISA per la determinazione di ZEA nella prima e seconda seduta analitica

Campione	Tipo campione	B/B0(%) Bianco campione	B/B0(%) Fortificati
Prima seduta			
1	Avena	116,40	36,39
2	Avena	117,90	38,76
3	Orzo	119,49	36,97
4	Orzo	105,01	31,86
5	Grano duro	118,00	36,52
6	Grano duro	118,68	33,07
7	Grano duro	119,40	35,18
8	Grano tenero	114,90	31,86
9	Grano tenero	114,84	34,01
10	Grano tenero	118,00	34,66
media		116,26	34,93
deviazione standard		4,28	2,27
varianza		18,31	5,15
Seconda seduta			
11	Avena	116,91	36,70
12	Avena	105,87	32,20
13	Orzo	118,61	36,87
14	Orzo	117,63	38,92
15	Grano duro	119,20	37,13
16	Grano duro	115,51	32,20
17	Grano duro	115,15	34,22
18	Grano tenero	118,71	33,21
19	Grano tenero	119,69	35,30
20	Grano tenero	118,15	34,84
media		116,54	35,16
deviazione standard		4,03	2,25
varianza		16,02	5,06

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta con un programma computerizzato calcolando la varianza (ANOVA test), il test di Fisher, il test di Student.

Le variabili sono state modificate utilizzando piani sperimentali secondo la procedura elaborata da Youden (Tabella 2). Il metodo è risultato robusto per i parametri: preparazione del campione, apertura kit, filtrazione campioni, temperatura kit, lettura colorimetro e ditta metanolo.

La precisione è stata eseguita su tre livelli di fortificazione (50 µg/kg, 100 µg/kg, 200 µg/kg) e i risultati sono presentati in Tabella 3.

Tabella 2. Piano sperimentale per gli studi di robustezza (procedura di Youden) per le singole variabili

Variabile scelta	Livello nominale	Livello 1	Livello 2
Apertura kit	Aperto/chiuso	Aperto (A)	Chiuso (a)
Preparazione campioni	Fresco/giorno prima	Fresco (B)	Giorno prima (b)
Filtrazione campioni	Tipo di filtro	Su whatman (C)	Su carta bibula (c)
Temperatura kit	–	Portato a T ambiente da 1 h (D)	Portato a T ambiente da 45 min (d)
Tempo di agitazione manuale	–	3 min (E)	6 min (e)
Lettura colorimetro	–	Immediata (F)	Dopo 30 min dallo stop (f)
Ditta metanolo	Erba/Baker	Carlo Erba (G)	Baker (g)

Tabella 3. Livelli di fortificazione e valori medi di recupero e scarto tipo

Livelli di fortificazione	Valore medio	Scarto tipo	Recupero
50 µg/kg	45,63 µg/kg	2,30%	91,0%
100 µg/kg	84,22 µg/kg	3,49%	84,2%
200 µg/kg g	169,83 µg/kg	8,69%	84,0%

Discussione

Il metodo di prova nell'intestazione è risultato idoneo allo scopo della ricerca di ZEA in campioni di cereali per alimentazione umana. L'applicabilità del metodo è stata verificata effettuando prove su campioni prelevati in maniera ufficiale dagli organi competenti. Il metodo viene tenuto sotto controllo sia mediante la costruzione di opportune carte di controllo con frequenza trimestrale sia mediante la partecipazione a *ring test* organizzati dall'AIA. Seppur nei limiti di una ridotta casistica è possibile affermare che il sistema di vigilanza messo in atto risulta efficace e che i livelli di contaminazione riscontrati nei campioni analizzati non destano al momento preoccupazione di carattere igienico sanitario.

Bibliografia

1. Bhatnagar D, Yu J, Ehrich KC. Toxins of filamentous fungi. *Chemical Immunology* 2002;81:167-206.
2. Unione Europea. Decisione della Commissione del 12 agosto 2002 che attua la Direttiva 96/23/CEE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati (2002/657/CEE). *GUCE* L221, 17 agosto 2002
3. Desimoni E, Brunetti B. *Assicurazione di qualità nel laboratorio chimico. Validazione dei metodi di analisi*. Bologna: Edizioni CLUEB; 2003.
4. Gruppo di lavoro dei Laboratori di Chimica degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali. *Linee guida per la validazione intra-laboratorio di metodi di prova. Immunochimica di screening in accordo con la decisione 2002/657/CE*. 2007.
5. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 1126/2007 della Commissione, del 28 settembre 2007, che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le Fusarium -tossine nel granoturco e nei prodotti a base di granoturco. *GUCE* L 255*,* 29 settembre 2007.

METODOLOGIE DIAGNOSTICHE MOLECOLARI AI FINI DEL RAPIDO RILEVAMENTO IN BACCA D'UVA DEL FUNGO TOSSIGENO *A. CARBONARIUS*

Patrizia De Rossi (a), Massimo Reverberi (b), Antonella Del Fiore (a), Valentina Tolaini (b), Anna Adele Fabbri (b), Corrado Fanelli (b)
(a) Dipartimento Biotecnologie, Agroindustria e Protezione della Salute, Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile (ENEA) Centro Ricerche Casaccia, Roma
(b) Dipartimento di Biologia Vegetale, Università "Sapienza", Roma

Introduzione

L'Ocratossina A (OTA) risulta la principale micotossina segnalata nell'uva e nei suoi derivati, essa ha proprietà nefrotossiche, carcinogene, teratogene e immunodepressive. Responsabili della presenza di questo metabolita nelle uve sono principalmente funghi appartenenti al genere *Aspergillus* sezione Nigri (*aspergilli neri*) la cui presenza provoca marciume nelle bacche di *Vitis vinifera*. Tra le specie appartenenti a questo genere *Aspergillus carbonarius* mostra il più alto potenziale ocratossigenico in uva (1).

Lo scopo di questo studio è quello di individuare un sistema che consenta il rilevamento il più possibile tempestivo della presenza di *A. carbonarius* direttamente dalla bacca d'uva al fine di contribuire a realizzare un rapido ed efficace controllo della contaminazione da fungo. A tal fine in questo lavoro è stata messa a punto una tecnologia che utilizza la tecnica di *Real Time Polymerase Chain Reaction* (PCR) per la discriminazione di *A. carbonarius*. In particolare sono stati sviluppati due set di *primer* specie-specifici sulla base della regione ITS (*Internal Transcribed Spacer*), noti per il loro utilizzo negli studi filogenetici, e sulla base di sequenze parziali del gene codificante per la polichetide sintasi, enzima responsabile della biosintesi dell'OTA.

Alle condizioni testate in questo lavoro i *primer* individuati sono risultati essere specifici nei confronti del solo *A. carbonarius* sia *in vitro* che *in vivo* ed entrambi i *primer* hanno dimostrato la capacità di rilevare la presenza del fungo anche quando l'ispezione allo stereomicroscopio non lo permetteva. Inoltre l'uso della *Real Time* PCR ha dimostrato di migliorare le prestazioni di 100 o di 1000 volte rispetto alla PCR classica rendendo possibile l'individuazione della presenza del fungo già dopo 6h, momento in cui sono presenti solo circa 20 conidi/gr di bacca d'uva.

Materiali e metodi

Inoculo di *Aspergillus carbonarius* su bacca d'uva

Bacche d'uva precedentemente sterilizzate superficialmente sono state inoculate con 10 µL di una sospensione acquosa contenente 1-5 conidi di *A. carbonarius*. Le bacche non inoculate hanno costituito il controllo. Le bacche d'uva sono state incubate a 30°C per 6h, 12h, 24h, 48 ore. Al termine dell'incubazione ciascuna bacca è stata sottoposta a conta dei conidi ed estrazione di DNA.

Estrazione del DNA

Le bacche d'uva sono state sottoposte ad estrazione del DNA utilizzando il metodo TRIS-SDS *Lysis Buffer*. È stato inoltre estratto il DNA da sei differenti cultivar d'uva prelevate in due differenti stazioni italiane (zone di Velletri e di Bari).

Polymerase Chain Reaction Real Time

Due set di *primer* specie-specifici sono stati disegnati usando il software Primer Express. Una coppia è stata disegnata sulla base di regioni ITS (*Internal Transcribed Spacer*), note per il loro utilizzo negli studi filogenetici. Tali *primer* (AcITSfor2/AcITSrev1 5'-GTGAAGTCTGAGTCGATTGTT-3'; 5'-GGAAAAAAAGGTTGGAGTT-3') amplificano un frammento di 239 bp. L'altra coppia di *primer* è stata disegnata sulla base di sequenze parziali del gene codificante per la polichetide sintasi (Gene Bank: AY540952), enzima responsabile della biosintesi dell'OTA; in questo caso *i primer* (Acpksfor/Acpksrev2 5'-GCAGCGGGAGTCAATGTAAT-3'; 5'-GCGTCGTACAAAGCCTCTT-3') amplificano un frammento di 330 bp. Diluizioni note di DNA plasmidico (0,01 pg÷1 μg) contenente il frammento d'interesse sono state preliminarmente amplificate e quantizzate per ottenere la curva di taratura (R^2=0,99); il segnale di fluorescenza è stato messo in relazione al quantitativo di DNA nei campioni.

Le condizioni ottimali di amplificazione sono stete: 95°C per 10 min, 45 cicli a 95°C per 15 secondi, 67,1°C (per la coppia di *primer* Acpksfor/Acpksrev2) oppure 66°C (per la coppia AcITSfor2/AcITSrev1) per 30 secondi e 72°C per 20 secondi.

Risultati

Le condizioni di PCR *Real Time* messe a punto con entrambe le coppie di *primer* hanno mostrato un'elevata sensibilità permettendo di amplificare quantità di DNA fungino rispettivamente di 1 pg (Acpksfor/Acpksrev) e 0,01 pg (AcITSfor2/AcITSrev1), migliorando le prestazioni di 100 o di 1000 volte rispetto alla PCR classica (dati non mostrati).

I dati (Figura 1) mostrano come mediante la PCR *Real Time* è possibile rilevare e quantificare il DNA fungino estratto da matrice inoculata artificialmente con 1-5 conidi/gr di bacca d'uva dopo solo 6 h dall'inoculo, tempo in cui sono presenti circa 20 conidi per grammo di bacca d'uva (Figura 2).

Inoltre, *i primer* hanno permesso di rilevare il DNA di *A. carbonarius* su bacche prelevate da due stazioni italiane del centro e sud Italia (Velletri e Bari) (Figura 3). I campioni che risultano avere la più alta concentrazione di DNA di fungo avevano, al momento della raccolta, evidenti segni di marciume ad una ispezione visiva; mentre gli altri campioni risultati positivi allo screening della PCR *Real Time*, pur non mostrando evidenti segni di marciume, al momento della raccolta, hanno sviluppato il micelio fungino quando le bacche provenienti dallo stesso grappolo dei campioni erano poste ad incubare per 7 giorni a 30°C.
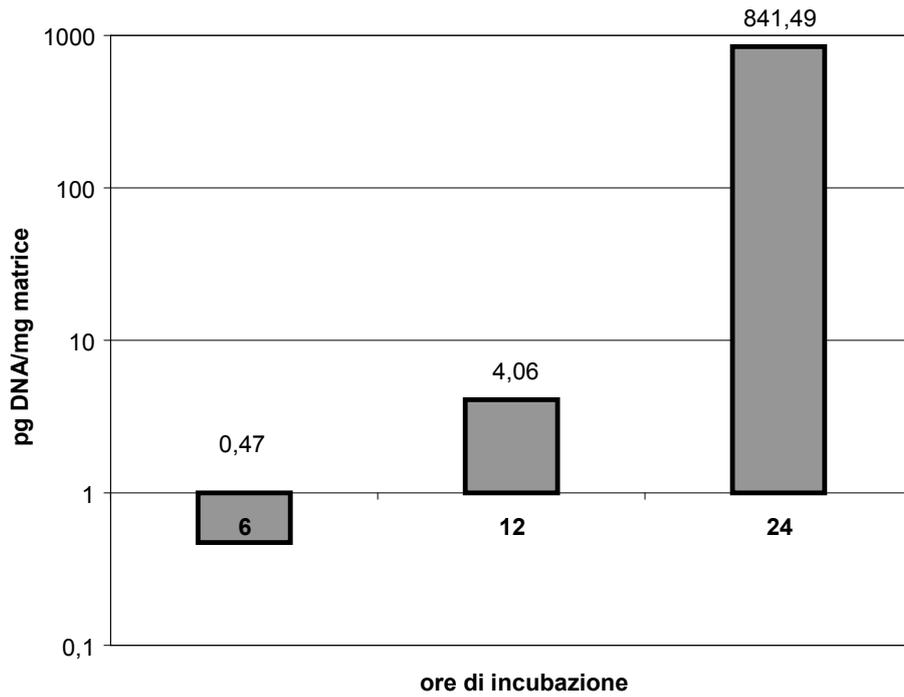
Figura 1. Quantificazione di DNA di *A. carbonarius* in campioni di uva inoculata (1-5 conidi/gr di bacca d'uva e incubati per 6h,12h 24h, a 30°C. Il DNA è stato quantificato usando la SYBR Green PCR *real-time* con i *primer* pks (Acpksfor/Acpksrev2). I valori sono il risultato di tre repliche in tre esperimenti indipendenti
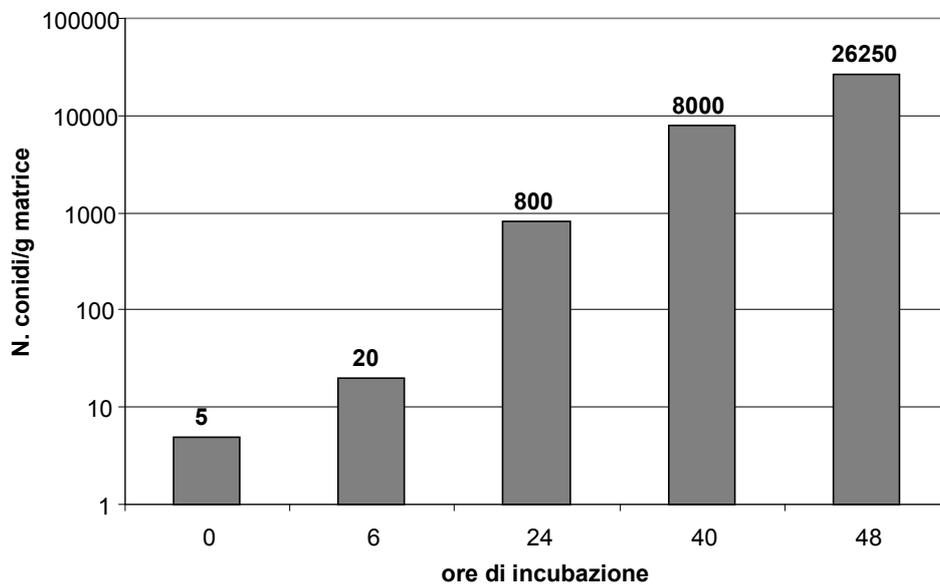
Figura 2. Numero di conidi presenti su grammo di bacca d'uva dopo 0, 6, 24, 40, 48 ore di incubazione a 30°C. Ciascuna bacca d'uva è stata inoculata con 1-5 conidi/10 µL. I valori sono il risultato di tre repliche in tre esperimenti indipendenti
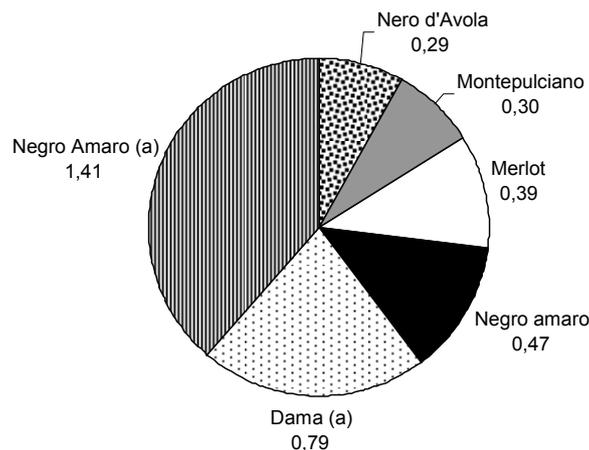
Figura 3. Quantificazione di DNA di *A. carbonarius* per tipologia di cultivar su campioni di uva raccolta che ad una ispezione visiva mostravano evidenti segni di marciume. Il DNA è stato quantificato usando la PCR *Real Time* con i *primer* Acpksfor/Acpksrev2 e SYBR Green. I valori sono il risultato di tre repliche in tre esperimenti indipendenti

Conclusioni

La possibilità di controllare efficacemente le contaminazioni fungine, in particolare quelle da funghi micotossigeni, rappresenta uno dei principali obiettivi da perseguire in campo alimentare per ottenere alimenti di alta qualità. In tale contesto rientra questo studio che risponde all'esigenza di disporre di tecniche molecolari per il rilevamento tempestivo della presenza di *A. carbonarius* in bacca d'uva

I risultati ottenuti mostrano come le tecniche molecolari messe a punto in questo lavoro rappresentino un contributo concreto alla prevenzione dalla contaminazione fungina permettendo di individuare la presenza del fungo direttamente da bacca d'uva tal quale senza necessità di isolare precedentemente la microflora, identificarla e sottoporre ad estrazione il micelio fungino. Alle condizioni testate in questo lavoro la PCR *Real Time* ha permesso di individuare la presenza di *A. carbonarius* già a 6 h dopo l'inoculo cioè quando sono presenti solo 20 conidi per grammo di bacca (2) d'uva. L'elevata sensibilità dei *primer* testati e della PCR *Real Time*, è inoltre dimostrata dalla capacità del sistema di rilevare la presenza del fungo su campioni reali.

Bibliografia

1. Perrone G, Mule` G, Susca A, Battilani P, Pietri A, Logrieco A. Ochratoxin A Production and Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of Aspergillus carbonarius, Aspergillus tubingensis, and Aspergillus niger Strains Isolated from Grapes in Italy. *Applied and Environmental Microbiology* 2006;72:680-5
2. Selma MV, Martinez-Culebras PV, Aznar R. Real Time PCR based procedures for detection and quantification of Aspergillus carbonarius in wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 2008;122:126-34.

CELER AFLA B_1: UN ELISA VELOCE E PRATICO PER LA DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA B_1 NELLE DERRATE ALIMENTARI

Francesca Diana, Vanessa Bacer, Barbara Puppini, Lidija Persic, Maurizio Paleologo
Tecna srl, Trieste

Introduzione

Le Aflatossine B_1, B_2, G_1 e G_2 (AFB_1, AFB_2, AFG_1 e AFG_2) sono metaboliti tossici e cancerogeni prodotti principalmente dalle muffe *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, che possono contaminare svariate derrate alimentari e mangimi. Questi funghi si sviluppano sia in campo che durante lo stoccaggio, qualora si creino le condizioni ideali di temperatura (25°C) e di umidità dell'aria (pari o superiore all'85%) (1, 2). Di conseguenza, la contaminazione da Aflatossine può verificarsi sia prima che dopo la raccolta (3). La tossicità causata da tali tossine, detta aflatossicosi, può essere sia di tipo acuto che cronico (1, 4), e si manifesta principalmente a livello del fegato, causando necrosi, cirrosi e carcinomi (5, 6). Le Aflatossine sono state classificate dallo IARC (*International Agency for Research on Cancer*) tra i carcinogeni del gruppo I (7).Tra le quattro molecole, l'AFB_1 è la più abbondante e la più tossica. A causa di questi severi effetti sulla salute, la Comunità Europea, così come la *US Food and Drug Administration*, l'Organizzazione Mondiale per la Sanità (8) e la *Food and Agriculture Organisation* (FAO) (9) hanno fissato dei tenori massimi per le Aflatossine B e G.

La necessità dell'applicazione dei limiti di legge ha portato allo sviluppo di diversi metodi analitici per la determinazione delle Aflatossine negli alimenti. Tra questi, i saggi ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) risultano dei metodi di screening veloci, accurati ed economici, che permettono l'analisi di un elevato numero di campioni in un'unica seduta analitica.

Il presente lavoro descrive le prestazioni del kit *Celer* AFLA B_1, un immunosaggio competitivo diretto per la determinazione quantitativa dell'AFB_1. Il kit permette la determinazione dell'Aflatossina in campioni di cereali, frutta a guscio e frutta secca, nonché in matrici complesse come germe di mais e mangimi. Si tratta di un saggio di facile e rapido utilizzo, con un intervallo di dosaggio in linea con le direttive europee in merito ai tenori massimi di AFB_1 permessi nel cibo destinato all'alimentazione umana (10) così come nei mangimi (11).

Materiali e metodi

Saggio ELISA per la determinazione dell'Aflatossina B_1

Il kit *Celer* AFLA B_1 è un ELISA competitivo diretto per la determinazione dell'Aflatossina B_1. Il saggio viene effettuato su micropiastra di polistirene precedentemente adsorbita con anticorpi anti-Aflatossina B_1. Durante una prima incubazione avviene una competizione fra le molecole di Aflatossina libere, contenute nelle soluzioni standard o nei campioni, e l'Aflatossina legata all'enzima, per i siti di legame dell'anticorpo anti-Aflatossina adsorbito ai

pozzetti della micropiastra. Segue la fase di lavaggio della micropiastra per eliminare tutto ciò che non si é legato in maniera specifica alla fase solida. Il legame dell'enzima all'anticorpo si rileva mediante l'aggiunta di una soluzione di substrato cromogeno incolore, il quale viene convertito dall'enzima in un prodotto di reazione colorato. Dopo aver bloccato la reazione enzimatica, l'assorbanza viene misurata con un lettore colorimetrico di micropiastre a 450 nm. I segnali di assorbanza ottenuti vengono trasformati in segnale di assorbanza relativo % (OD/OD dello standard zero x 100 = B/B0%). I risultati sono stati elaborati con il software Magellan (Tecan). Per la curva standard possono essere impiegate l'elaborazione punto a punto, la retta di regressione lineare o la *cubic spline*, senza significative differenze nei dosaggi.

Campioni

Sono stati analizzati campioni di cereali (mais, germe di mais), mangimi, nocciole, noci, arachidi, pistacchi, uvetta, fichi secchi. Sono stati impiegati campioni di riferimento FAPAS, campioni fortificati e campioni naturalmente contaminati.

I campioni sono stati estratti per 3 minuti con soluzioni metanoliche e successiva filtrazione (Whatman n. 1), secondo quanto riportato per ciascuna matrice nel libretto di istruzioni del kit *Celer* AFLA B_1.

Risultati

Caratteristiche del saggio

Il kit *Celer* AFLA B_1 è un ELISA specifico per la determinazione quantitativa dell'AFB_1, l'unico presente sul mercato. La Tabella 1 mostra i valori di *cross*-reattività nei confronti delle altre Aflatossine B e G. Con questo saggio è possibile analizzare campioni di cereali, frutta a guscio e frutta secca, nonché matrici complesse come germe di mais e mangimi. È un saggio di facile e rapido utilizzo: i campioni vengono estratti con soluzioni metanoliche senza necessità di purificazioni; l'esecuzione del test è semplice, le determinazioni vengono eseguite in singolo e sono richiesti in totale per l'analisi solo quindici minuti.

Tabella 1. Cross-reattività del kit Celer AFLA B_1 provata su 3 sedute analitiche

Composto	Cross-reattività %
AFB_1	100
AFB_2	5 ± 1
AFG_1	19 ± 1
AFG_2	<1

La Figura 1 riporta la curva di taratura media del kit *Celer* AFLA B_1 (n. = 38 sedute analitiche), che dimostra l'elevata riproducibilità del saggio, nonostante l'impiego di soluzioni standard ad elevato contenuto di metanolo. L'intervallo di misura del saggio, da 1 a 40 µg/kg, si adatta all'analisi di tutti i prodotti destinati all'alimentazione umana, in quanto i tenori massimi di contaminazione di AFB_1 previsti (10) sono compresi tra 2 e 8 µg/kg, fatta eccezione per gli alimenti per l'infanzia, per i quali il limite è stato posto a 0,1 µg/kg. In maniera analoga, il kit

Celer AFLA B_1 si dimostra particolarmente adatto come metodo di screening per i mangimi, per i quali i limiti di legge rientrano nell'intervallo 5-20 µg/kg (11).
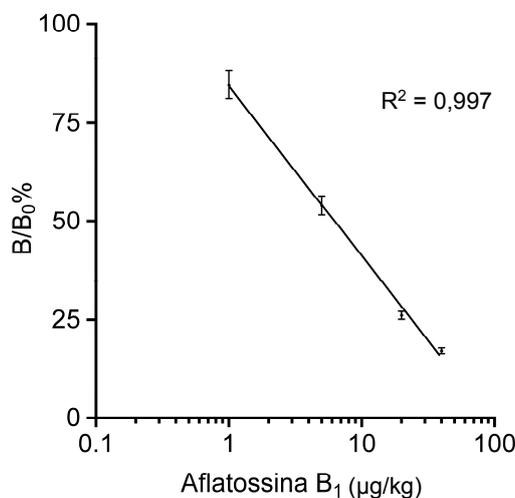
Figura 1. Curva di taratura media su 38 sedute analitiche del saggio *Celer* AFLA B_1

Limite di rivelazione e specificità del saggio

Il limite di rivelazione (*Limit Of Detection*, LOD) del kit *Celer* AFLA B_1 è stato determinato per le matrici mais, fichi secchi, uvetta, nocciole, pistacchi, secondo il criterio descritto per i test quantitativi per l'Aflatossina nella USDA/GIPSA Program Notice FGIS-PN 04-15 (12). Venti campioni negativi per ciascuna matrice sono stati analizzati nel saggio e dal valore medio dei B/B_0 meno 2 deviazioni standard è stato ottenuto un valore di LOD di 1 µg/kg per tutte le matrici considerate. Secondo la medesima normativa USDA/GIPSA il LOD deve essere inferiore o uguale a 3 µg/kg.

La specificità del saggio ottenuta per le stesse matrici è riportata nella Tabella 2. La probabilità di rilevare dei falsi positivi con il kit *Celer* AFLA B_1 è pari a zero per la frutta secca e la frutta a guscio e del 5,5% per i campioni di mais.

Tabella 2. Specificità del saggio *Celer* AFLA B_1 provata su 20 campioni negativi

Matrice	Specificità (%)
Mais	94,5
Fichi secchi	100,0
Uvetta	100,0
Nocciole	100,0
Pistacchi	100,0

Sensibilità del saggio

La sensibilità del kit *Celer* AFLA B_1, intesa come limite di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ), è stata determinata verificando quale fosse la minor concentrazione di

AFB_1 rilevabile dal saggio con una probabilità del 95%. Il LOQ è stato determinato per le matrici mais, fichi secchi, uvetta, nocciole, pistacchi e i valori ottenuti sono riportati nella Tabella 3.

Tabella 3. LOQ del saggio *Celer* AFLA B_1 su 20 campioni addizionati

Matrice	LOQ (µg/kg)
Mais	1
Fichi secchi	2
Uvetta	2
Nocciole	1
Pistacchi	1

Accuratezza e precisione del saggio

Il kit *Celer* AFLA B_1 è stato validato sulle matrici mais, germe di mais, mangimi, frutta secca e frutta a guscio.

Nelle Tabelle 4 e 5 sono riportati i risultati di accuratezza, in termini di valori di recupero %, e di precisione dei dosaggi, in condizioni di ripetibilità e di riproducibilità, espressa in termini di deviazione standard relativa (coefficiente di variazione, CV%).

Il recupero medio per il mais è risultato essere del 124±22% e del 91±21%, rispettivamente per i campioni di riferimento FAPAS e per i campioni fortificati.

I recuperi ottenuti per le altre matrici sono: 91±21% per i campioni di germe di mais naturalmente contaminati; 108±20% per i mangimi di riferimento FAPAS; 98±18% per la frutta a guscio e 113±18% per la frutta secca.

Tabella 4. Accuratezza e precisione (CV%) del saggio *Celer* AFLA B_1 nel dosaggio di campioni di mais di riferimento FAPAS e fortificati.

Campioni di mais	Valore assegnato (range di accettabilità) o addizionato (µg/kg)	Dosaggio (µg/kg) *(media ± SD, n.= 9)*	Recupero % *(media ± SD, n. = 9)*	CV %*	
				Intra-Saggio	Inter-Saggio
Materiali di riferimento					
T0481	1,27 (0,71-1,83)	1,9 ± 0,3	149 ± 22	5,6 ± 1,5	13,1
T0497	3,91 (2,19-5,63)	4,3 ± 0,2	109 ± 6	3,7 ± 3,5	2,8
T0473	4,66 (2,61-6,71)	5,8 ± 0,8	125 ± 17	6,8 ± 5,3	8,2
T04105	5,21 (2,92-7,50)	5,8 ± 0,5	112 ± 9	3,5 ± 0,7	15,3
		Recupero % (media ± SD, n = 36): 124 ± 22			
Materiali fortificati					
Mais pool 5	1	1,2 ± 0,1	123 ± 14	10,0 ± 1,1	16,0
	2	1,7 ± 0,1	86 ± 5	4,5 ± 1,1	3,7
	5	3,9 ± 0,5	79 ± 11	4,1 ± 1,2	8,2
	10	7,7 ± 0,7	77 ± 7	4,1 ± 2,5	2,7
		Recupero % (media ± SD, n = 36): 91 ± 21			

* CV% intrasaggio: 3 determinazioni per ogni campione, media CV± SD di 3 sedute analitiche; CV% intersaggio: 1 determinazione per ogni campione in 3 sedute analitiche

Tabella 5. Accuratezza e precisione del saggio *Celer* AFLA B_1 nel dosaggio di diverse matrici naturalmente contaminate, fortificate o di riferimento (FAPAS)

Campioni	Valore assegnato (range di accettabilità) o addizionato (µg/kg)	Dosaggio (µg/kg) *(media ± SD, n.= 9)*	Recupero % *(media ± SD, n. = 9)*	CV %*	
				Intra-Saggio	Inter-Saggio
Germe di mais naturalmente contaminato					
Germe 1	9,93*	10,4 ± 2,7	105 ± 27	6,3 ± 3,6	26,5
Germe 2	22,97*	20,7 ± 2,1	90 ± 9	5,1 ± 2,9	10,9
Recupero % germe di mais (media ± SD, n = 18): 97 ± 21					
Mangimi di riferimento					
T0478	7,28 (4,08-10,48)	9,6 ± 0,8	123 ± 11	3,8 ± 2,3	9,0
T0491	11,30 (6,40-16,30)	11,9 ± 1,8	105 ± 16	5,2 ± 1,9	12,1
T04102	18,10 (1,20-26,10)	15,4 ± 0,9	85 ± 5	2,8 ± 1,6	3,9
T0486	22,97 (12,86-33,08)	24,8 ± 2,5	108 ± 11	6,1 ± 3,3	2,0
Recupero % mangimi (media ± SD, n = 36): 108 ± 20					
Frutta a guscio fortificata e di riferimento					
Nocciola 1	20,00	17,2 ± 1,4	86 ± 7	3,9 ± 5,1	ND
Nocciola 2	11,67	11,7 ± 2,6	100 ± 22	4,5 ± 0,5	ND
Pistacchio 1	8,00	7,8 ± 1,2**	97 ± 15	ND	ND
Pistacchio 2	1,16	1,6 ± 0,1**	134 ± 7	ND	ND
Pistacchio 3	1,70	2,1 ± 0,2**	121 ± 11	ND	ND
Arachide T0484	1,54 (0,86-2,22)	1,4 ± 0,1	93 ± 6	6,1 ± 3,8	ND
Noce T04117	4,35 (2,44-6,27)	6,83	157	ND	ND
Recupero % frutta a guscio (media ± SD, n =25): 98 ± 18					
Frutta secca fortificata e di riferimento					
Fico 1	2	1,9 ± 0,2**	95 ± 11	10,8	ND
Fico 2	2.1	2,9 ± 0,2**	133 ± 8	6,1	ND
Fico T0483	4.36 (2.44-6.28)	4,9 ± 0,0	114 ± 1	0,3	ND
Recupero % frutta secca (media ± SD, ***n*** = 6): 113 ± 18					

ND: non determinato; *: media di 3 analisi in HPLC in tre diversi laboratori; **: media di due determinazioni

Complessivamente, i recuperi per il mais addizionato nel range 2-10 µg/kg, il germe di mais e la maggior parte dei mangimi e della frutta a guscio rientrano nell'intervallo 70-110%, come richiesto nella direttiva 98/53/CE per i metodi di analisi per il controllo ufficiale (13). Tutti i valori di recupero ottenuti per i campioni contaminati con quantità di AFB_1 pari o superiore a 5 µg/kg rientrano nei requisiti del *United States Department of Agriculture's* (USDA) *Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration* (GIPSA) (12).

Per quanto riguarda la precisione, i valori di CV% intra- e inter-saggio sono risultati conformi, per tutti i campioni considerati, a quanto richiesto nella medesima direttiva CE (13) e ai criteri USDA-GIPSA (12).

Nella Tabella 6 sono riportati i risultati della partecipazione con il kit *Celer* AFLA B_1 a due studi interlaboratorio organizzati dall'Associazione Italiana Allevatori nel corso del 2008 e del 2009. I bassi valori di *z-score* ottenuti sono indice di elevata accuratezza dei dosaggi nella matrice mais.

Tabella 6. Risultati della partecipazione di Tecna con *Celer* AFLA B_1 a due *ring test* organizzati dall'Associazione Italiana Allevatori

Identificativo *ring test*	Campioni di mais	AFB₁ (µg/kg)			*z-score*
		Valore addizionato	Valore assegnato*	Dosaggio con *Celer* AFLA B₁	
Ottobre 2008	1	0	0,03	< 1	-
	2	40	36,85	43,67	0,63
	3	20	19,36	22,99	0,73
	4	12	11,41	13,39	0,62
Marzo 2009	1	8	10,81	9,9	- 0,30
	2	40	36,97	37,29	0,02
	3	20	20,78	20,18	- 0,09
	4	0	0,10	< 1	-

*: valore assegnato come media dei risultati di rispettivamente 18 e 12 partecipanti con metodo HPLC.

La Figura 1 mostra i grafici di correlazione ottenuti rispettivamente per i campioni di mais fortificati (Figura 1 A) e per i mangimi di riferimento FAPAS (Figura 1 B). Per il mais, una buona correlazione (R^2 = 0,9739) si accompagna ad un basso effetto matrice e ad una limitata dispersione dei dati (Sy.x = 0,437). Per i mangimi, a causa dall'eterogeneità dei campioni analizzati, si osserva un effetto matrice superiore e una maggiore dispersione dei dati (Sy.x = 2,071), nonostante la buona correlazione ottenuta (R^2 = 0,9355).
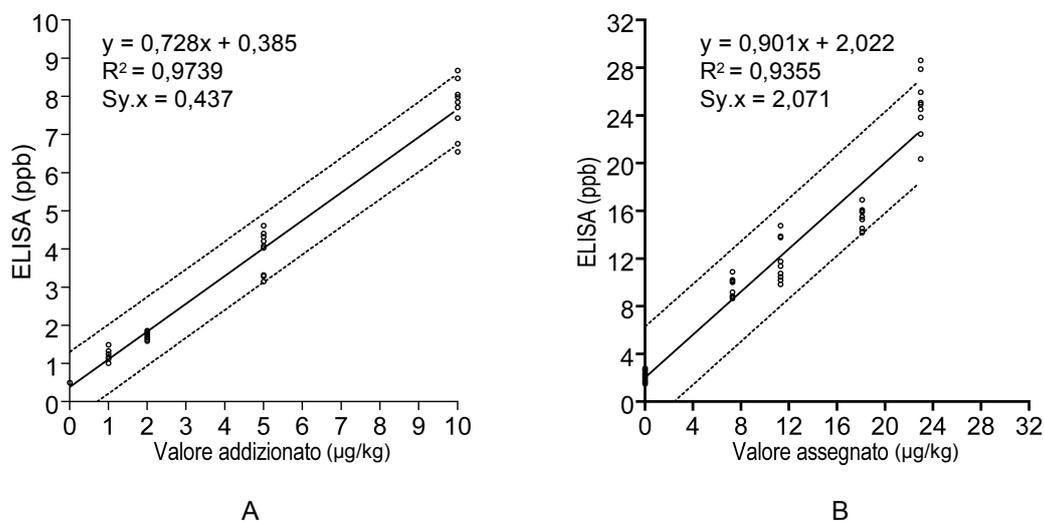
Figura 2. Correlazione tra valore di Aflatossina B1 addizionato in campioni di mais (A) o assegnato in campioni di mangimi (B) e determinazione nel saggio *Celer* AFLA B1

Conclusioni

I risultati ottenuti indicano che *Celer* AFLA B_1, unico kit rapido specifico per l'AFB_1 attualmente sul mercato, permette un'analisi accurata e precisa su diversi tipi di matrici. Il suo intervallo di misura in linea con i limiti di legge, unito a semplicità e rapidità nell'esecuzione dell'analisi, rendono questo kit un metodo di screening adatto all'analisi di materiali destinati sia all'alimentazione umana che animale.

Bibliografia

1. Council for Agricultural Science and Technology. *Mycotoxins: risks in Plant, Animal and Human Systems.* Ames, IA: CAST; 2003.(*Task force report* 139)
2. Dorner JW. Management and prevention of mycotoxins in peanuts. *Food Additives & Contaminants* 2008;25(2):203-8.
3. Scudamore KA, Banks JN. The fate of mycotoxins during cereal processing. In: Barug D, van Egmond H, López-García, van Osenbruggen T, Visconti A (Ed.). *Meeting the mycotoxin menace.* Wageningem, The Nederlands: Wageningen Academic Publishers; 2004. p165-81.
4. Shephard GS. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Additives & Contaminants* 2008;25(2):146-51.
5. Phillips TD, Afriyie-Gyawu E, Williams J, Huebner H, Ankrah N-A, Ofori-Adjei D, Jolly P, Johnson N, Taylor J, Marroquin-Cardona A, Xu L, Tang L, Wang J-S. Reducing human exposure to aflatoxin through the use of a clay: a review. *Food Additives & Contaminants* 2008;25(2):134-45.
6. Eaton DL, Gallagher EP. Mechanism of aflatoxin carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1994;34:135-172.
7. World Health Organizatiopn; International Agency for Research on Cancer. *IARC monograph on the evaluaion of carcinogenic risk to humans*. *Volume 82. Some tradiiotnal herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*. Lyon, France: IARC Press; 2002.
8. World Health Organisation. *Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-six report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.*. Geneva: WHO; 2002. (WHO Technical Report Series 906).
9. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *Worldwide regulation for mycotoxins in food and feed in 2003*. Rome: FAO; 2004. (FAO Food and Nutrition paper 81).
10. Unione Europea. Regolamento della Commissione Europea (CE) 19 dicembre 2006, n. 1881/2006. *Giornale Ufficiale dell'Unione Europea*, L364:5-24.
11. Unione Europea. Direttiva della Commissione Europea 31 ottobre 2003, n. 2003/100/CE. *Giornale Ufficiale dell'Unione Europea*, L285:33-37.
12. United States Department of Agriculture; Grain Inspection, Packers and Stockyards Administation; Federal Grain Inspection Service. *Performance evaluation criteria for aflatoxin test kits.* Program Notice FGIS-PN-04-15 del 16 giugno 2004.
13. Unione Europea. Direttiva della Commissione Europea 16 luglio 1998, n. 98/53/CE. *Giornale Ufficiale dell'Unione Europea*, L201:93-101

ANALISI MULTIRESIDUO DI MICOTOSSINE IN CEREALI PER LA PRIMA COLAZIONE E *BABY FOOD* CON TECNICA HPLC/FLUORIMETRO E HPLC/MS/MS

Maria Ferrari, Barbara Romagnoli, Cecilia Bergamini
Riferimento Analitico Regionale (RAR) Alimenti, OGM e Biosicurezza, Agenzia Regionale Protezione Ambiente dell'Emilia Romagna, Sezione Provinciale di Bologna, Bologna

Introduzione

La normativa europea prevede limiti per diverse classi di micotossine nei cereali destinati all'alimentazione umana; al momento sono fissati i livelli massimi per Aflatossine (AF), Ocratossina A (OTA), Deossinivalenolo (DON) e Zearalenone (ZEA), mentre si stanno valutando i limiti per le Tossine T2 e HT-2 (1). Al fine di realizzare un'attività di controllo efficace ed efficiente, che consenta di monitorare tutte le micotossine normate, in un elevato numero di campioni, ottimizzando i tempi e i costi di analisi, è necessario sviluppare metodi multiresiduo che permettano di estrarre e quantificare più micotossine contemporaneamente.

In questo lavoro sono state testate due tipologie di colonnine di immunoaffinità (IAC): una per la determinazione simultanea di AFLA e OTA (AlfaOchra HPLC^{TM} Vicam), seguita da analisi in HPLC/Fluorimetro (*High Performance Liquid Chromatography*) e un'altra per DON, ZEA, T2, HT-2 (DZT R-Biopharm-Rhône LTD), seguita da quantificazione in LC-MS/MS (*Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*). I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli dei metodi precedentemente validati, e correntemente in uso dal laboratorio, sulle IAC singole di AFLA, OTA, DON e ZEA. Nell'ambito di questa sperimentazione per la prima volta sono state ricercate le tossine T2 e HT-2. Sono stati ottenuti buoni livelli di recupero, sia in campioni di cereali per la prima colazione, sia in *baby food*, a due livelli di contaminazione, prossimi ai limiti di legge. I limiti di rivelazione sono inferiori alle concentrazioni massime ammesse nei *baby food*: AFLA 0,05 µg/kg, OTA 0,08 µg/kg, DON 60 µg/kg, ZEA, T2 e HT-2 10 µg/kg. Le prestazioni ottenute soddisfano i criteri di rendimento stabiliti dal Reg. CE 401/2006 (2).

Le colonnine multi-micotossine sono state utilizzate per l'analisi di alcuni prodotti commerciali destinati al controllo ufficiale e campionati dagli organi competenti.

Materiali e metodi

Materiali

Le soluzioni degli standard di AF (Aflatoxin Mix, AFB_1 e AFG_1 1 µg/mL, AFB_2 e AFG_2 0,3 µg/mL, in metanolo), OTA (50 µg/mL, in benzene/acido acetico 99/1), DON (200 µg/mL, in etilacetato/metanolo 95/5) e ZEA (50 µg/mL, in acetonitrile) sono fornite da Supelco. Gli standard di T2 e HT-2 sono forniti da R-Biopharm Rhône LTD in forma cristallina, sono stati ricostituiti in acetonitrile, come indicato sul certificato di accompagnamento, ad una concentrazione di 100 µg/mL e conservati a -20°C.

L'acqua ultrapura è prodotta con un impianto Milli-Q (Micropore Corporation, Billerica, MA, USA). Tutti i reagenti sono forniti da Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia): l'acetonitrile e il metanolo sono di grado HPLC, il fosfato bibasico di sodio, il fosfato monobasico di potassio e il cloruro di sodio, utilizzati per la preparazione del tampone fosfato (*Phosphate Buffered Saline*, PBS), così come acetato di ammonio, il bromuro di potassio, l'acido acetico glaciale, l'acido nitrico sono di grado tecnico.

Le colonnine di immunoaffinità AlfaOchra HPLC^{TM} sono fornite da Vicam, le colonnine DZT sono della ditta R-Biopharm-Rhône LTD. I filtri di carta sono di Carlo Erba Reagenti, quelli in fibra di vetro sono di Munktell, Bärenstein, Germany.

Preparazione del campione AflaOchra

50 g di campione finemente macinato, a cui sono aggiunti 5 g di sodio cloruro, sono estratti con 100 mL di metanolo/H_2O (80/20 v/v) agitando per 30 minuti. Dopo filtrazione su carta 10 mL di estratto sono diluiti con 40 mL di H_2O (per i *baby food* 20 mL di filtrato sono diluiti con 50 mL di H_2O) e nuovamente filtrati su fibra di vetro. 25 mL (50 mL per i *baby food*) della soluzione così ottenuta sono caricati sulla colonnina di immunoaffinità (AlfaOchra HPLC^{TM} Vicam) (3). La colonnina è lavata con 10 mL di H_2O e portata a secco facendo flussare aria; le tossine sono eluite con 2 mL di metanolo in un matraccio tarato da 5 mL, si porta a volume con H_2O. Nel caso dei *baby food* l'estratto ottenuto viene portato a secco sotto vuoto con evaporatore rotante con bagnomaria a 35°C. Il residuo è disciolto in 1 mL di metanolo/H_2O (2/3 v/v). Il campione finale è iniettato in HPLC/fluorimetro.

Analisi HPLC/Fluorimetro

Per la determinazione di AF e OTA è stato utilizzato un cromatografo liquido ad alta prestazione Perkin Elmer Serie 200. Vengono effettuate 2 corse cromatografiche distinte. In entrambi i casi si utilizza una colonna Discovery C18 (25 cm x 4.6 mm, 5 µm), con pre-colonna C18, Supelco (Milano, Italia). Colonna e pre-colonna sono termostaste a 25°C:

- per AF
  Fase mobile: H_2O/acetonitrile/metanolo (6/2/3 v/v/v), ad ogni litro di fase mobile si aggiungono 350 µL di HNO_3 4,0 mol/L e 120 mg di potassio bromuro. Flusso: 0,9 mL/min. Lunghezza d'onda di eccitazione: 360 nm; lunghezza d'onda di emissione: 435 nm. Volume di iniezione: 200 µL. Tempo di analisi 15 min. Cella elettrochimica Kobra per derivatizzazione post-colonna (4).
- per OTA
  Fase mobile: acetonitrile/H_2O/acido acetico (51/47/2 v/v/v). Flusso: 1,0 mL/min. Lunghezza d'onda di eccitazione 333 nm, lunghezza d'onda di emissione 443 nm. Volume di iniezione 200 µL. Tempo di analisi 12 min (5).

Preparazione del campione DZT

25 g di campione finemente macinato sono estratti con 100 mL di metanolo/acqua (75/25 v/v); dopo 30 minuti di agitazione l'estratto viene passato su filtro di carta. Per i campioni di cereali 2 mL di filtrato sono diluiti con 48 mL di PBS, per i *baby food* 5 mL di filtrato sono diluiti con 120 mL di PBS. L'estratto diluito è filtrato su fibra di vetro e passato su colonnina di immunoaffinità (DZT R-Biopharm-Rhône LTD) (25 mL per i cereali, 100 mL per i *baby food*)

alla velocità di 1-2 gocce al secondo (6). La colonnina è lavata con 10 mL di H_2O. Le tossine sono eluite con 2 mL di metanolo e la colonnina asciugata facendo flussare aria. Il campione viene portato a secco sotto vuoto con evaporatore rotante con bagnomaria a 35°C. Il residuo è disciolto in 1 mL di metanolo/H_20 20/80 (v/v) + 5mM acetato di ammonio e analizzato in LC-MS/MS.

Analisi in LC-MS/MS

Lo strumento utilizzato per l'identificazione e la quantificazione di DON, ZEA, T2 e HT-2 è un HPLC Alliance® 2695 combinato con uno spettrometro di massa Tandem Quattro MicroTM API (Waters, Milliford, MA, USA). Lo spettrometro opera in modalità MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), con ionizzazione *elettrospray* (ESI) in modalità "alternata" negativa-positiva-negativa.

I parametri di massa sono stati ottimizzati mediante infusione diretta, a un flusso di 10 µL/min, di 4 soluzioni contenenti le singole tossine a una concentrazione di 2 µg/mL; per ZEA, T2 e HT-2 la soluzione di infusione è stata preparata in metanolo, per DON in metanolo/acqua (20/80 v/v) + 5mM di ammonio acetato. In Tabella 1 sono indicati i parametri di *tuning* dello ione precursore e dei frammenti selezionati per i quattro composti. I parametri operativi ottimali sono: voltaggio del capillare, 4,0 kV, temperatura della sorgente ESI, 120°C, temperatura di desolvatazione, 400°C, flusso del gas di desolvatazione, 300 L/h (azoto prodotto dal generatore High Purity Nitrogen Generetor, Peak Scientific, Scozia).

Per la separazione cromatografia è stata utilizzata una colonna Discovery C18 (25 cm x 2,1 mm, 5 µm), termostatata a 25°C. L'eluizione è condotta in gradiente, come indicato in Tabella 2. Il flusso della fase mobile è 0,3 mL/min e il tempo di analisi di 30 minuti.

Per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati si è utilizzato il software MassLynx 4.0 (Waters, Milliford, MA, USA).

Tabella 1. Parametri di *tuning* degli ioni precursori e dei frammenti selezionati

Analita	Tr (min)	Ion mode	Voltaggio Cono (V)	Transizione di quantificazione	Energia di collisione (eV)	Transizione di conferma	*Dwell* (s)
DON	11,30	ESI -	15,0	355>295	11,0	355>265	0,2
ZEA	17,50	ESI -	40,0	317>160	30,0	317>132	0,2
T2	18,15	ESI +	20,0	484>305	15,0	484>215	0,2
HT-2	19,00	ESI +	15,0	442>263	15,0	442>215	0,2

Tabella 2. Gradiente di eluizione

Tempo (min)	Eluente A % (H_2O + 10 mM NH_4Ac)	Eluente B % (metanolo)
0,0	90,0	10,0
12,0	10,0	90,0
18,0	10,0	90,0
20,0	90,0	10,0
30,0	90,0	10,0

Risultati e discussione

Determinazione simultanea di AFB_1 e OTA

Le rette di taratura per le AF sono state ottenute partendo da una soluzione di lavoro contenente le quattro Aflatossine in metanolo, preparata per diluizione dello standard Supelco, alle concentrazioni di 0,1 µg/mL per AFB_1 e AFG_1 e di 0,03 µg/mL per AFB_2 e AFG_2. Sono stati analizzati 5 livelli di concentrazione negli intervalli 0,4 – 4,0 ng/mL per AFB_1 e AFG_1 e 0,1 – 1,2 ng/mL per AFB_2 e AFG_2. Il coefficiente di correlazione è sempre maggiore di 0,99. Tenendo conto dei passaggi di diluizione del metodo di preparazione del campione, il limite di rivelazione è 0,05 µg/kg per i *baby food* e 0,5 µg/kg per i cereali.

La retta di taratura per OTA è stata ottenuta partendo da una soluzione di lavoro in metanolo, preparata per diluizione dello standard Supelco, alla concentrazione di 1,0 µg/mL. Sono stati analizzati 6 livelli di concentrazione nell'intervallo 0,5-20 ng/mL. Il coefficiente di correlazione è sempre maggiore di 0,99. Tenendo conto dei passaggi di diluizione del metodo di preparazione del campione, il limite di rivelazione è 0,08 µg/kg per i *baby food* e 0,8 µg/kg per i cereali.

Le prestazioni delle colonnine AlfaOchra HPLC™ Vicam sono state valutate con 6 prove ripetute, a due livelli di contaminazione, prossimi ai limiti di legge (1) per i cereali e i *baby food*. Un campione bianco di cereali per la prima colazione e uno di farina per l'alimentazione destinata alla prima infanzia, sono stati contaminati mediante aggiunta di standard ai livelli indicati in Tabella 3.

Tabella 3. Recuperi % delle IAC AlfaOchra HPLC™ Vicam, confrontati con quelli delle IAC singole

Analita	Livello di Contaminazione (µg/kg)		R% IAC AflaOcra	R% IAC Singole
AFB_1	cereali	2,0	90	94 [1]
	baby food	0,6	78	
AFB_2	cereali	2,0	97	98 [1]
	baby food	0,6	90	
AFG_1	cereali	2,0	95	91 [1]
	baby food	0,6	70	
AFG_2	cereali	2,0	100	100 [1]
	baby food	0,6	80	
OTA	cereali	4,0	90	97 [2]
	baby food	0,5	92	

[1] Easy Extract Aflatoxin R-Biopharm-Rhône LTD, [2] Ochraprep R-Biopharm-Rhône LTD

I recuperi delle colonnine di immunoaffinità (IAC) AlfaOchra HPLC™ Vicam sono stati confrontati con i recuperi medi, ottenuti dai controlli di qualità interni effettuati con IAC singole (Easy Extract Aflatoxin e Ochraprep R-Biopharm-Rhône LTD) durante gli ultimi 3 anni di lavoro. Per entrambi i livelli di contaminazione le prestazioni delle IAC multi-micotossine e delle IAC singole sono confrontabili e soddisfano i criteri di rendimento stabiliti dal Reg. CE 401/2006 (2).

Determinazione simultanea di DON, ZEA e tossine T2 e HT2 (DZT)

Quattro rette di taratura sono state ottenute partendo da una soluzione standard di lavoro in metanolo/acqua (1/4 v/v) + 5mM di ammonio acetato contenente le quattro micotossine in miscela, alle seguenti concentrazioni: DON 12 µg/mL, ZEA 1,5 µg/mL, T2 e HT-2 2 µg/mL.

Sono stati analizzati 4 livelli di concentrazione negli intervalli: DON 60-480 ng/mL, ZEA 7,5-60 ng/mL, T2 e HT-2 10-80 ng/mL. Il coefficiente di correlazione è sempre maggiore di 0,99. Il limite di rivelazione è di 60 µg/kg per DON e 10 µg/kg per ZEA, T2 e HT-2, sia per i *baby food*, sia per i cereali.

Le prestazioni delle IAC DZT R-Biopharm-Rhône LTD sono state valutate con 6 prove ripetute, a due livelli di contaminazione, prossimi ai limiti di legge (1) per i cereali (adulti) e i *baby food*. Un campione bianco di cereali per la prima colazione e uno di farina per l'alimentazione destinata alla prima infanzia, sono stati contaminati mediante aggiunta della soluzione standard di lavoro, utilizzata per la retta di taratura, ai livelli indicati in Tabella 4. I cromatogrammi delle transizioni per i campioni contaminati ai due livelli *baby* e adulti sono riportati nelle Figure 1 e 2.

Tabella 4. Recuperi % delle colonnine DZT, confrontati con quelli delle IAC singole.

Analita	Livello di Contaminazione (µg/kg)		R% AC DZT	R% IAC Singole
DON	cereali	480	75	98 [1]
	baby food	190	60	
ZEA	cereali	60	70	108 [1]
	baby food	20	70	
T2	cereali	80	90	Non testato
	baby food	30	95	
HT-2	cereali	80	90	Non testato
	baby food	30	95	

[1] Donprep R-Biopharm-Rhône LTD, [2] Easy Extract Zearalenone R-Biopharm-Rhône LTD
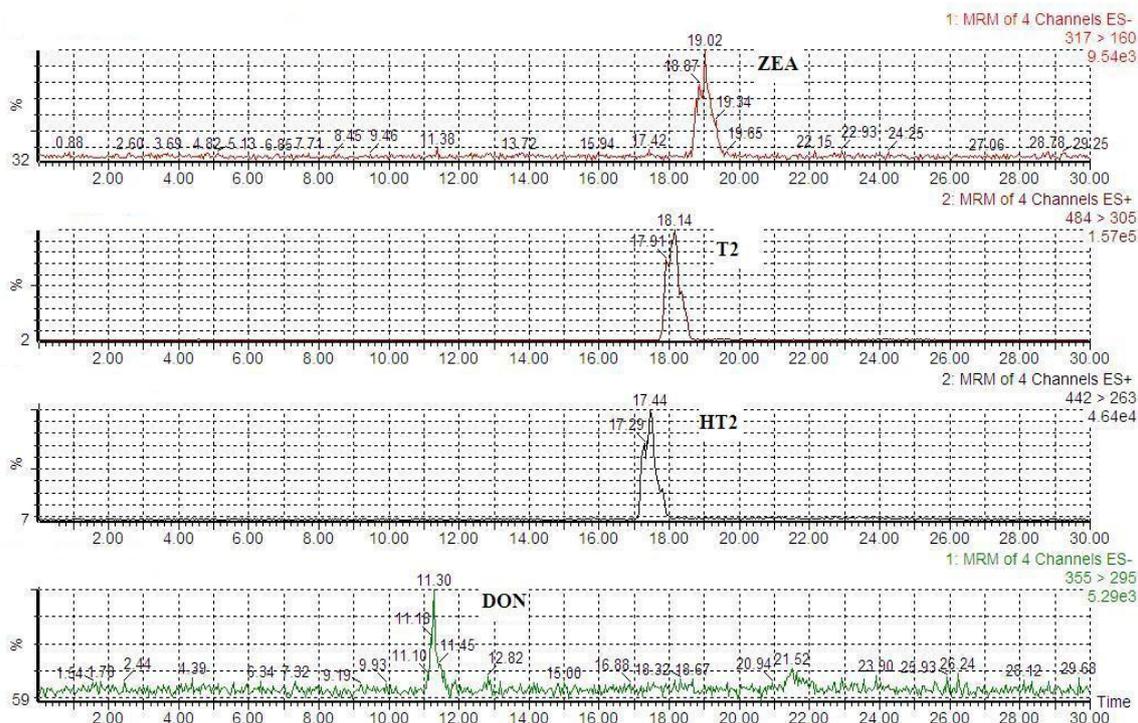
Figura 1. Cromatogrammi delle transizioni di quantificazione per DON, ZEA, T2 e HT-2 in un campione di *baby food* contaminato a livelli prossimi ai limiti di legge
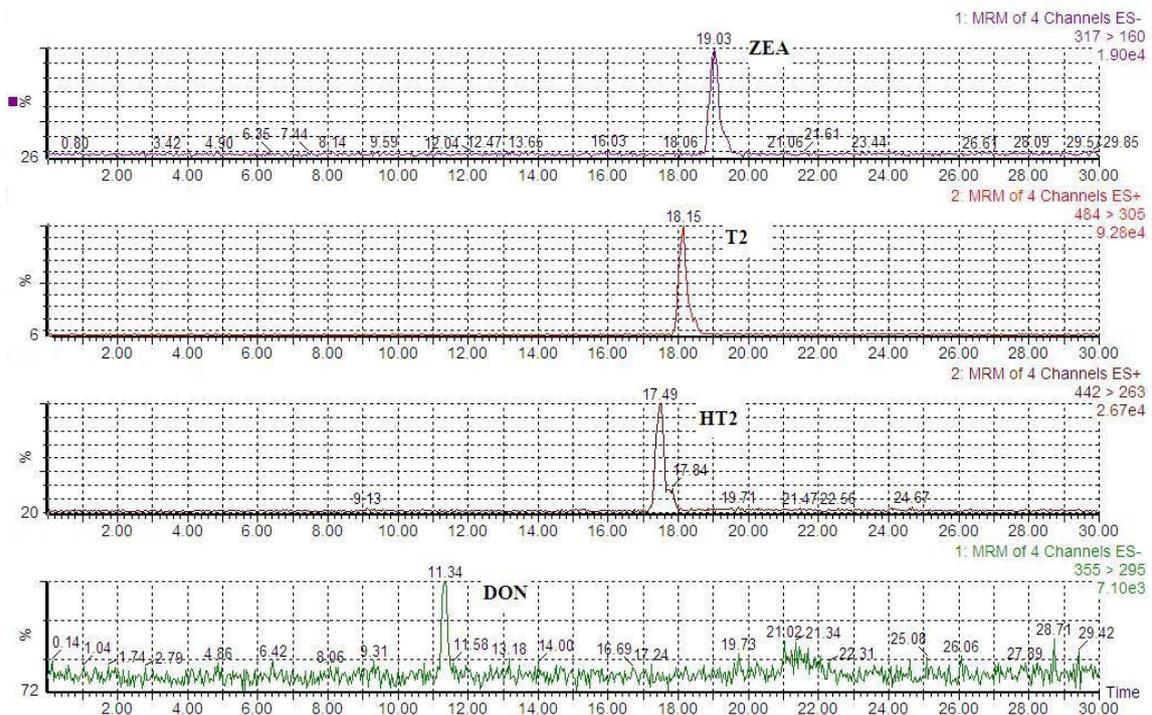
Figura 2. Cromatogrammi delle transizioni di quantificazione per DON, ZEA, T2 e HT-2 in un campione di cereali contaminato a livelli prossimi ai limiti di legge

I recuperi delle IAC multimicotossine DZT sono stati confrontati con i recuperi medi, ottenuti dai controlli di qualità interni effettuati con le IAC singole (Donprep e Easy Extract Zearalenone, R-Biopharm-Rhône LTD) durante gli ultimi 3 anni di lavoro. Per entrambi i livelli di contaminazione le prestazioni delle IAC multi-micotossine sono inferiori a quelle delle IAC singole, pur rientrando nei criteri di rendimento stabiliti dal Reg. CE 401/2006 (2). Il valore di recupero più critico è quello del DON al livello di contaminazione del limite di legge dei *baby food*.

Controllo di campioni commerciali

Il metodo è stato utilizzato per l'analisi di 37 campioni (11 cereali per la prima colazione e 16 *baby food*) prelevati nel 2009, nell'ambito del piano regionale per il controllo delle micotossine della Regione Emilia Romagna. I risultati sono riportati in Tabella 5.

Nessuno dei campioni presenta livelli di contaminazione superiori ai limiti di legge. AFLA e OTA risultano sempre inferiori al limite di rivelazione. La metà dei campioni di cereali per la prima colazione è contaminata da DON; la presenza di ZEA è stata trovata in 3 campioni. Le Tossine T2 e HT-2 sono state rilevate in 4 campioni, 2 di cereali e 2 di baby food.

Tabella 5. Monitoraggio dei 37 campioni commerciali di creali e baby food analizzati nel 2009

Micotossina	Cereali 1° colazione		*Baby food*	
	µg/kg	n. campioni	µg/kg	n. campioni
AFB_1	< 0,5	11	< 0,05	16
	0,5-2,0	/	0,05-0,10	–
OTA	< 0,8	11	< 0,08	16
	0,5-3,0	/	0,08-0,50	–
DON	< 60	5	< 60	16
	60-500	6	60-200	–
ZEA	< 10	8	< 10	16
	10-50	3	10-20	–
T2	< 10	11	< 10	15
	> 10	/	> 10	1
HT-2	< 10	9	< 10	15
	> 10	2	> 10	1

Conclusioni

In questo lavoro sono stati messi a punto due metodi: il primo per la determinazione simultanea di AFLA e OTA, con quantificazione mediante HPLC/Fluorimetro, il secondo per DON, ZEA, T2 e HT-2, con analisi in LC-MS/MS. I metodi sono entrambi accurati, selettivi e sensibili. I bassi limiti di rivelazione ne consentono l'applicazione per il controllo ufficiale di cereali e alimenti destinati alla prima infanzia (*baby food*). I recuperi ottenuti, tutti compresi tra 60 e 100%, soddisfano i criteri di rendimento indicati dal Reg. CE 401/2006.

I due metodi presentano alcuni vantaggi in termini di riduzione dei tempi e dei costi di analisi: con due sole colonnine di immunoffinità è possibile controllare sullo stesso campione 9 micotossine. Inoltre il metodo per DON, ZEA, T2 e HT-2 necessita di una sola corsa cromatografica e fa uso di un'unica soluzione di lavoro, contente le 4 tossine in miscela, sia per la preparazione della retta di taratura, sia per la contaminazione dei campioni

Bibliografia

1. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *GUCE* L364, 20 dicembre 2006, aggiornato il 23 luglio 2008.
2. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *GUCE* L70, 9 marzo 2006.
3. AlfaOchra HPLC™ Instruction Manual # GN-MC9521-1, VICAM Science Technology, 03.08.1999.
4. AOAC Official method 999.07. *Aflatoxin B1 and total Aflatoxins in peanuts butter, pistacchio paste, fig paste, and paprika powder*. AOAC International; 2000.
5. AOAC Official method 2000.03. *Ochratoxin A in barley*. AOAC International; 2002.
6. R-Biopharm-Rhône LTD Application note for DZT Multi Myco IACs for LCMS determination. Ref. N°: A1-P73.V2. Aug 2007

VALIDAZIONE INTRA-LABORATORIO DI UN METODO ELISA PER LA RIVELAZIONE DELL'AFLATOSSINA M_1 IN LATTE

Pasquale Gallo (a), Grazia Guadagnuolo (a), Valentina Pellis (b), Chiara Tarantino (b), Carmela Rossini (a), Luigi Serpe (a)
(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici
(b) EuroClone SpA, Pero, Milano

Introduzione

In generale, nel laboratorio di controllo ufficiale è necessario eseguire uno studio di validazione del test ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), secondo quanto previsto dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 (1) e dalla normativa comunitaria. Per le micotossine, il Reg. CE 401/2006 (2) ha indicato i requisiti di prestazione solo dei metodi di prova quantitativi; il Reg. CE 882/2004 (3), in allegato III, prevede i parametri analitici da valutare nella validazione di tutti i metodi di prova: esattezza, applicabilità, LOD (*Limit of Detection*), LOQ (*Limit of Quantification*), ripetibilità, riproducibilità intra-laboratorio, recupero, specificità/selettività, linearità della risposta, incertezza di misura ed eventualmente altri parametri analitici a scelta del laboratorio

In questo lavoro, è descritto uno schema generale per la valutazione delle prestazioni di un kit ELISA per la rivelazione dell'Aflatossina M_1 (AFM_1) nel latte di massa e termicamente trattato. La Commissione Europea ha fissato il limite massimo di AFM_1 a 0,050 µg/kg nel latte di massa e termicamente trattato (4).

Il metodo è stato validato intra-laboratorio per l'analisi di screening qualitativo, secondo i criteri descritti dalla linea guida dei settori chimici degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (5), e applicato al latte bovino, bufalino, ovi-caprino, sia di massa che termicamente trattato. In conformità a quanto previsto dal Reg. CE 882/2004, sono stati valutati l'applicabilità del kit, la specificità, l'intervallo della risposta lineare, il LOQ, la capacità di rivelazione ($CC\beta$), la robustezza per cambiamenti lievi. La capacità di rivelazione ($CC\beta$) è la minore quantità dell'analita che può essere rivelata, identificata e/o quantificata in un campione con una probabilità di errore $\beta \leq 5\%$. L'applicabilità e la robustezza per cambiamenti lievi (l'analista e la temperatura ambientale) sono relative all'osservazione delle conseguenze sui risultati di leggere variazioni sperimentali introdotte nel metodo. La specificità indica la capacità del metodo di distinguere tra l'analita da misurare e altre sostanze, con particolare riferimento agli interferenti di matrice.

Alcune modifiche della procedura di preparazione del campione sono state introdotte per ridurre il rumore di fondo (bias). Lo studio di validazione si basa sull'analisi statistica dei risultati, mediante un test F per verificare l'omoschedasticità dei dati, e un *paired t-test* per valutare la significatività del segnale medio dei campioni fortificati rispetto a quello dei campioni non contaminati.

Materiali e metodi

Metodo di prova ELISA

È stato usato il kit ELISA Aflatoxin M_1 (EuroClone Life Sciences, Siziano, PV, Italia) per l'analisi quantitativa in latte, latte in polvere ricostituito e formaggio mediante saggio immunochimici competitivo.

Il campione di latte di massa è tenuto 2 h a 4-6°C, oppure per una notte in frigorifero, poi centrifugato 5 min a 2000 *g* per separare i lipidi per affioramento, dopo avere rimosso il grasso sovrastante; trasferire 1 mL di campione in una provetta eppendorf, centrifugare a 10000 *g* per 10 min., prelevare e deporre nei pozzetti della piastra 200 µL di standard e campioni, incubare a temperatura ambiente (19º < T < 25ºC) per 2 h. Eliminare il liquido incubato e lavare 3 volte i pozzetti con PBS-Tween 20®. Aggiungere 100 µL di coniugato enzimatico *horseradish peroxidase* (HRP) a ogni pozzetto, incubare a temperatura ambiente per 15-20 min, lavare i pozzetti con PBS-Tween 20®; aggiungere 100 µL di substrato cromogeno (TMB, tetrametilbenzidina) a ogni pozzetto, incubare per 15 min. Fermare la reazione con 100 µL di *stop solution*, e misurare la densità ottica (OD) a 450 nm, con un lettore di micropiastre Microplate Reader Model 680 (BIO-RAD, Milano, Italia). Il saggio ELISA è stato eseguito usando soluzioni standard di AFM_1 a 0,004 - 0,005 - 0,010 - 0,025 - 0,050 - 0,100 ng/mL.

Studio di validazione intra-laboratorio

Il LOQ è stato determinato analizzando i bianchi campioni fortificati a concentrazioni decrescenti fino a 0,002 ng/g.

La specificità del metodo è stata valutata analizzando 2 campioni di latte di massa, pastorizzato e UHT, di origine bovina, bufalino e ovi-caprina, risultati non contaminati da AFM_1 all'analisi HPLC (bianchi campione).

Il CCβ è stato valutato al LOQ, analizzando i 20 campioni bianchi matrice fortificati a 0,004 ng/g. La robustezza del metodo è stata valutata analizzando i bianchi matrice e campioni fortificati in 2 sessioni di lavoro, con 2 analisti diversi e a temperature comprese tra 19° e 25°C. Il piano della validazione è riportato in Tabella 1.

Tabella 1. Sintesi del piano della validazione per la rivelazione di AFM_1 nel latte

Parametro	Criterio da valutare	Prove eseguite	Criterio di accettabilità
Specificità	Interferenza da parte della matrice	Analisi di 20 campioni non contaminati	Applicabile a tutti i tipi di latte
Recupero	Segnale relativo ai campioni fortificati significativamente diverso da quello dei bianchi	Analisi di 20 campioni non contaminati fortificati a 0,004 ng/g	Al massimo 1 falso negativo
CCβ (Capacità di rivelazione)	Errore β ≤ 5% a 0,004 ng/g	Dalla valutazione delle prove di recupero	Al massimo 1 falso negativo
Robustezza	Effetti di differenti condizioni sperimentali	Almeno 2 sessioni analitiche eseguite in differenti condizioni sperimentali	Nessuna variabilità tra i risultati complessivi delle sessioni analitiche

Analisi statistica dei dati

Per la verifica del CCβ è stata valutata l'omoschedasticità dei dati, per i campioni bianchi matrice e per i campioni fortificati, mediante un F-Test (5% di confidenza), confrontando le varianze dei due gruppi nell'ambito di ciascuna sessione di lavoro. Per verificare che la differenza tra la media dei segnali dei bianchi matrice e dei campioni fortificati fosse significativa è stato eseguito un t-test per dati appaiati (*paired t-test*, con p=0,05), e sono stati calcolati i valori di P ad una e due code. Tutti i calcoli sono stati eseguiti mediante il software Excel™ di Microsoft XP.

Risultati e discussione

La procedura del saggio ELISA è semplice e rapida. Le curve dose-risposta [*absorbance vs* log(AFM_1 concentration)] ottenute utilizzando gli standard forniti dal kit e gli standard del laboratorio sono lineari (Figura 1).
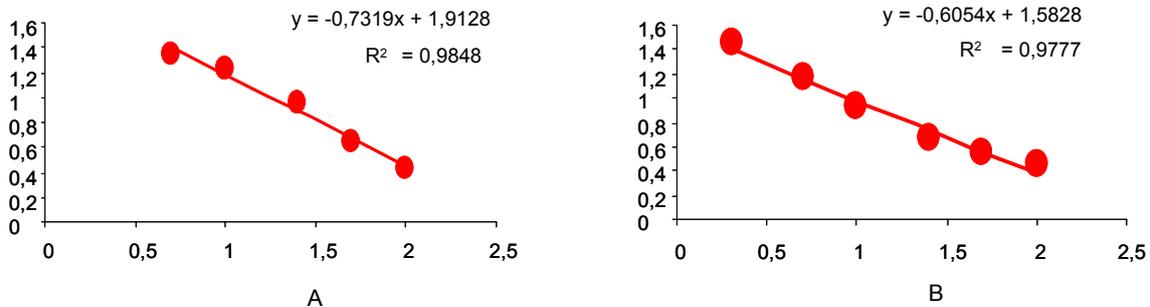
Figura 1. Curve dose-risposta [absorbance *vs* log(AFM_1 concentration)] con gli standard forniti dal kit (A) e gli standard del laboratorio (B)

Il produttore del kit dichiara un valore del LOD del saggio pari a 0,002 ng/mL, calcolato matematicamente sulla base della deviazione standard del segnale medio dei bianchi matrice per il latte bovino termicamente trattato (n = 18, CV <2%). Il LOQ del metodo è stato sperimentalmente determinato a 0,004 ng/g dall'analisi di campioni di latte di differente specie fortificati; questo valore è vicino al LOQ del metodo di conferma con cromatografia liquida-fluorescenza del laboratorio, a 0,002 ng/g.

La specificità del kit è stata verificata analizzando campioni di latte di massa bovino (8), ovi-caprino (2) e bufalino (5), e di latte termicamente trattato (2 UHT e 3 pastorizzati), non contaminati da AFM1.

Nessuno dei 20 campioni bianchi è risultato positive al test ELISA (Tabella 2). L'omoschedasticità dei dati, ottenuti in 2 diverse sessioni analitiche, è stata verificata mediante test F (Fosservato < F tabulato, 9 gradi di libertà, p=0,05) (Tabella 3).

Tabella 2. Analisi dei 20 campioni di latte bianchi e fortificati a 0,004 ng/g

Sessioni di lavoro	B/B_0 (%) gruppo dei campioni bianchi	B/B_0 (%) gruppo dei campioni fortificati	Campione di latte
Prima sessione	89,55	59,06	Latte bovino di massa
	92,22	72,13	Latte bovino di massa
	96,05	71,02	Latte bovino di massa
	94,54	76,77	Latte bovino di massa
	100,23	71,84	Latte bovino di massa
	102,06	47,94	Latte bovino di massa
	100,21	47,94	Latte bovino di massa
	87,23	58,79	Latte bovino di massa
	96,52	71,43	Latte UHT
	95,93	73,46	Latte pastorizzato
Seconda sessione	88,97	80,14	Latte UHT
	91,00	83,86	Latte pastorizzato
	94,66	83,22	Latte pastorizzato
	97,32	52,61	Latte di massa ovino
	98,15	52,54	Latte di massa di capra
	99,18	53,30	Latte di massa di bufalo
	99,86	54,95	Latte di massa di bufalo
	97,73	56,73	Latte di massa di bufalo
	96,43	58,31	Latte di massa di bufalo
	98,90	48,01	Latte di massa di bufalo

Tabella 3. Risultati del test F per la valutazione dell'omoschedasticità tra i dati i n due sessioni di lavoro (9 gradi di libertà, p=0,05). Per entrambi i gruppi $F_{calc} < F_{tab}$

valore F	Gruppo dei campioni bianchi	Gruppo dei campioni fortificati
F calculato	1,31	3,04
F tabulato	3,18	3,18

I campioni bianchi sono stati fortificati a 0,004 ng/g (il LOQ) e analizzati contestualmente ai bianchi durante 2 sessioni analitiche. Anche in questo caso è stata verificata l'omoschedasticità dei dati dei due gruppi (Tabella 3). A questo punto, sono state comparate le due serie di risultati mediante un t-test ad una coda per dati appaiati (p= 0,05) (Tabella 4); il valore di $t_{critico} = 1{,}734 > t_{calcolato} = 1{,}64 \times 10^{-8}$ dimostra che le medie dei due gruppi sono statisticamente differenti.

Il semi-intervallo di confidenza del segnale dei bianchi campione è stato calcolato con la formula:

$$\overline{S}_0 - \frac{t \cdot s_0}{\sqrt{n}} = 96{,}17 - \left(\frac{1{,}734 \cdot 3{,}98}{\sqrt{20}}\right)\% = 94{,}63\%$$

dove $\overline{S}_0$ è il segnale medio dei 20 bianchi campione;

t è il t-Student tabulato per 19 gradi di libertà per il test a 1 coda e p=0,05;

n è il numero di prova (20);

s_0 la radice quadrata della varianza del segnale dei 20 bianchi campione.

Nessun campione fortificato ha mostrato un segnale ($\%B/B_0$) > 94,63%, pertanto tutti sono individuate come "positivi". In questo modo si dimostra che l'errore β del saggio è <5% a 0,004 ng/g; questa concentrazione rappresenta anche la capacità di rivelazione, il CCβ del metodo,

ovvero il livello al di sopra del quale la presenza di AFM_1 nel campione è rivelata con una probabilità > 95%. Il risultato del t-test ad una coda prova anche la robustezza del metodo per cambiamenti lievi (l'analista, la temperatura ambiente, la specie).

Tabella 4. Risultati del t-test per dati appaiati (p= 0,05) dei due gruppi dei campioni bianchi e fortificati

Parametri statistici	Gruppo 1	Gruppo 2
Media	96,16718861	63,94571678
Varianza	15,81922432	158,3361576
Numero di osservazioni	19	19
Correlazione di Pearson	-0,599753614	
Differenza ipotizzata tra le medie	0	
Gradi di libertà	18	
Statistica t	9,177831568	
Valore di p, test a una coda	$1,64404^{E-08}$	
Valore critico di t, test a una coda	1,734063592	
Valore di p, test a due code	$3,28809 \cdot ^{E-08}$	
Valore critico di t, test a due code	2,00922037	

Conclusioni

È stato eseguito uno studio di validazione intra-laboratorio del metodo ELISA per la rivelazione della AFM_1 in latte, con elaborazione statistica dei dati per verificare le prestazioni in termini di specificità, LOQ, CCβ, robustezza per cambiamenti lievi, l'intervallo di risposta lineare. Per ridurre il rumore di fondo del segnale dei campioni (bias) è stata introdotta una centrifugazione ad alta velocità prima della reazione immunochimici in piastra.

Il campo di applicazione del kit è stato esteso a tutti i tipi di latte, sulla base dello studio statistico, indipendentemente dalla quantità di grasso. Il LOQ a 0,004 ng/g indica una elevate sensibilità del saggio; il CCβ del metodo è stato valutato al LOQ. Questo studio può rappresentare uno schema generale per la validazione dei saggi ELISA qualitativi per l'analisi delle micotossine.

Bibliografia

1. UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005. *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. Milano: UNICHIM; 2005.
2. Unione Europea. Regolamento (CE) N. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *GUCE* L70/12, 9 marzo 2006.
3. Unione Europea. Regolamento (CE) 882/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali. *GUCE* L 191, 30 aprile 2004.
4. Unione Europea. Regolamento (CE) N. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *GUCE* L364/5, 20 dicembre 2006, aggiornato il 23 luglio 2008.
5. Gruppo di lavoro dei Laboratori di Chimica degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali. Linea guida per la validazione intra-laboratorio di metodi di prova immunochimici di screening in accordo con la Decisione 2002/657/CE. Italia; 2004

ANALISI DI DEOSSINIVALENOLO: VALUTAZIONE INTER-LABORATORIO DEL LETTORE RIDA®QUICK SCAN

Dominique Jonville (a), Bernhard Reck (b), Marcel Bony (c)
(a) BASF Agrochemical Division, Francia
(b) R-Biopharm AG, Germania
(c) R-Biopharm France, Francia

Introduzione

Le micotossine sono metaboliti secondari che si sviluppano verso la fine della fase di crescita esponenziale delle muffe in base a diversi fattori ambientali. Le micotossine possono essere presenti in prodotti agricoli, quali ad esempio cereali, a seconda dell'influenza dei singoli fattori ambientali, e possono trovarsi anche in associazione agli alimenti, carne e prodotti lattiero-caseari di origine animale.

Il Deossinivalenolo (DON) appartiene al gruppo dei Tricoteceni ed è prodotto da funghi del genere *Fusarium.* Il DON si trova spesso in prodotti di origine vegetale, in particolare nei cereali. Tra i Tricoteceni, DON, 3-acetil- e 15-acetil-Deossinivalenolo sono le tossine maggiormente presenti in Europa e nel nord America. Le concentrazioni di tossine trovate nel frumento, nel mais e nel riso solitamente sono espresse in valori di mg/kg. A causa delle loro proprietà citotossiche e immunosoppressive, queste tossine rappresentano un rischio per la salute dell'uomo e degli animali.

Il nuovo lettore RIDA® QUICK SCAN sviluppato da R-Biopharm AG è stato valutato in Francia in uno studio di collaborazione tra R-Biopharm Francia e la divisione Agrochimica della BASF. Il lettore è stato valutato utilizzando il kit RIDA® QUICK DON di R-Biopharm AG. Questo kit è commercializzato in Francia da R-Biopharm Francia con il nome di RIDA® QUICK DON e dalla divisione Agrochimica della BASF con il nome di Qualidon. La procedura indicata per il Qualidon si diversifica da quella del RIDA® QUICK DON solo per il quantitativo di campione, di 2 g rispetto ad 1g per il RIDA® QUICK DON.

È stato organizzato un *ring test* coinvolgendo 8 laboratori (privati e pubblici, appartenenti principalmente all'industria dei cereali) e analizzando 6 campioni di grano macinati per la determinazione di DON utilizzando, parallelamente, 3 tecniche analitiche diverse:

- ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (1 laboratorio, mediante l'uso del kit RIDASCREEN® FAST DON distribuito da R-Biopharm AG);
- HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (4 laboratori)
- kit RIDA®QUICK DON (6 laboratori).

Materiali e metodi

Il kit RIDA® QUICK DON si basa su principi immunocromatografici: sono utilizzati anticorpi monoclonali e un coniugato su *strip*. Un campione può essere considerato positivo per il DON quando sulla *card* si visualizzano 2 bande colorate, mentre è negativo se si sviluppa una sola banda. L'intensità del colore della banda è letta mediante il lettore ed è valutata in base ad

una curva standard prestabilita che permette di eseguire la quantificazione di DON. Il tempo totale richiesto per l'analisi, dall'estrazione del campione fino alla lettura dei risultati, è inferiore a 15 minuti. Un altro vantaggio è che i risultati ottenuti tramite il lettore possono essere stampati o esportati su PC per la conservazione e la rintracciabilità dei valori.

Il metodo utilizzato per lo studio ha un intervallo di rivelazione compreso tra 0,5 e 5,5 mg/kg (è anche possibile avere un intervallo compreso tra 0,25 e 0,9 mg/kg modificando il rapporto tra il campione e il tampone di estrazione). 2 g di un campione macinato rappresentativo sono stati aggiunti a 30 mL di tampone di estrazione e sono stati mescolati vigorosamente per 3 minuti. La sospensione è stata poi filtrata mediante carta da filtro Whatman n. 1 e 100 µL del surnatante sono stati applicati sull'area di analisi della strip.

I risultati sono stati letti dopo 5 minuti utilizzando il lettore RIDA®QUICK SCAN.

Risultati e conclusioni

I campioni di grano sono stati testati per DON in un circuito di analisi da 6 diversi laboratori che hanno usato lateral flow strip e un lettore portatile. I risultati sono stati confrontati con i dati ottenuti con HPLC ed ELISA.

I campioni sono stati classificati da 0,5 a 2,5 mg/kg (500-2500 µg/kg). I risultati ottenuti con il lettore RIDA®QUICK SCAN sono in accordo con quelli in HPLC ed ELISA nel 95% dei casi, tenendo in considerazione un'incertezza del 30% sui risultati in HPLC durante l'analisi (Tabella 1).

Tabella 1. Risultati del *ring test* con metodi HPLC-ELISA per l'analisi di DON in campioni di grano

Campioni (grano)	Media HPLC (2 lab)	HPLC 1	HPLC 2	HPLC 3	HPLC 4	ELISA RIDASCREEN® FAST DON (1 lab)
1	0,302	0,33	0,27	0,40	0,30	0,34
2	2,335	2,59	2,08	2,79	2,34	2,58
3	1,285	1,44	1,13	1,65	1,29	1,19
4	1,830	1,97	1,69	2,71	1,83	1,83
5	1,115	1,17	1,06	1,31	1,12	1,13
6	0,947	1,05	0,84	0,92	0,95	0,99

I campioni con livelli di DON superiore a 2 mg/kg mostrano la più alta variazione dei risultati con ciascun test, mentre nell'intervallo 0,5-2 mg/kg la variabilità è significativamente più bassa. Questo indica che la maggiore variabilità dei risultati con il sistema a flusso laterale nei confronti dell'analisi HPLC, dipende in misura importante dalla variazione della contaminazione di micotossina nei campioni.

La mediana dei metodi messi a confronto presenta una sorprendente elevata conformità (Tabella 2). La ripetibilità delle misure e la conferma con altri metodi garantisce statisticamente il risultato in caso di incertezza.

Tabella 2. Risultati del *ring test* con metodo RIDA® QUICK DON + RIDA® QUICK SCAN per l'analisi di DON in campioni di grano

Laboratori	Campioni (grano)					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Lab 1	<0,5	1,78	1,08	1,44	1,15	1,02
Lab 2	<0,5	1,67	<0,5	1,95	1,28	0,78
Lab 3	<0,5	2.41	1,35	2.43	1,39	1,20
Lab 3 (repet.)	<0,5	2,91	1,59			1,32
Lab 4	<0,5	2,21	1,13	1,8	1,42	1,09
Lab 4 (repet.)	<0,5	1,97	1,23	2,06	1,29	1,02
Lab 5	<0,5	2,54	1,75	2,35	1,29	1,40
Lab 6	<0,5	2,52	1,62	2,04	<0,5	0,92
Lab 6 (repet.)	<0,5		1,32		1,28	0,89
Mediana	-	2,34	1,32	2,00	1,29	1,02
Media	-	2,26	1,37	1,99	1,28	1,06
Dev. std	-	0,04	0,23	0,10	0,10	0,20

Questo studio preliminare conferma le eccellenti prestazioni del kit RIDA®QUICK DON (Qualidon) quando è utilizzato con il nuovo lettore RIDA® QUICK SCAN sviluppato dal gruppo R-Biopharm.

ANALISI MEDIANTE AFLAOCHRA PREP® IN ASSOCIAZIONE ALL'HPLC IN FLUORESCENZA PER LA DETERMINAZIONE DELLE AFLATOSSINE TOTALI E DELL'OCRATOSSINA A

David Leeman, Elaine C. Marley
R-Biopharm Rhone Ltd, Glasgow, Scozia, Regno Unito

Introduzione

Le Aflatossine (AF) e l'Ocratossina A (OTA) sono metaboliti tossici prodotti da muffe del genere *Aspergillus*. Questi funghi sono presenti quasi ovunque e si sviluppano in condizioni di caldo e umido. Gli alimenti e i mangimi sono suscettibili alla contaminazione di tali funghi durante la crescita, la raccolta o la conservazione. Le AF sono cancerogene mentre l'OTA è nefrotossica. Entrambi i gruppi di micotossine possono svilupparsi in una vasta gamma di alimenti, inclusi i cereali, la frutta secca e le spezie. Per tutti questi gruppi alimentari, sono stati introdotti limiti legislativi europei relativi alle AF totali (4-10 μg/kg), all'Aflatossina B_1 (AFB_1) (2-5 μg/kg) e all'OTA (3-10 μg/kg).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di sviluppare colonne ad immmunoaffinità AFLAOCHRA PREP® che consentano l'isolamento e la concentrazione di AFB_1, Aflatossina G_1 (AFG_1), Aflatossina B_2 (AFB_2), Aflatossina G_2 (AFG_2) e OTA. Inoltre, è stata impostata una sola serie di condizioni per l'HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), basandosi sull'uso della KOBRA® cell per la derivatizzazione di AFB_1 e AFG_1, ed è stata permessa la quantificazione di tutte e cinque le micotossine con una singola analisi. Il metodo è stato validato per la determinazione di AF totali e OTA in cereali, frutta secca e spezie. L'impiego di un solo metodo di preparazione del campione e di una singola impostazione dell'HPLC consente di avere un volume maggiore di campione e una riduzione dei solventi e dei materiali di consumo.

Materiali e metodi

Trattamento del campione e selezione del livello di arricchimento

I campioni sono stati analizzati per testare la naturale contaminazione di tutte e 5 le tossine. I livelli di arricchimento sono conformi a quelli della legislazione europea o almeno 5 volte rispetto al naturale livello di contaminazione di ogni singola tossina. I valori di recupero sono stati sempre ricondotti alla contaminazione naturale.

Gli *step* della preparazione del campione si possono così sintetizzare:

1) pesare 25 g di campione macinato nel contenitore per miscelatore;
2) aggiungere 5 g di cloruro di sodio e 100 mL di metanolo: acqua (80:20, v/v);
3) miscelare per 2 minuti ad alta velocità e filtrare con carta da filtro Whatman N° 113;
4) 4a) per i cereali: diluire 1 mL di filtrato con 9 mL di PBS (*Phosphate Buffered Saline*)
   4b) per la frutta secca e le spezie: diluire 1mL di filtrato con 9 mL di Tween 20 al 10% in PBS;

5) mescolare bene e lasciare riposare per 5 minuti;
6) far passare il filtrato diluito attraverso un filtro Whatman GF/A;
7) far passare 10 mL (= 0,25 g equivalenti) di filtrato diluito attraverso la colonna AFLAOCHRA PREP®;
8) lavare la colonna con 20 mL di PBS;
9) eluire le tossine con 1 mL di metanolo seguito da 1 mL di acqua;
10) iniettare 100 µL di campione in un sistema per HPLC.

Le condizioni cromatografiche sono:
- Rilevazione: AF $\lambda_{eccitazione}$ 362 nm, $\lambda_{emissione}$ 442 nm, OTA $\lambda_{eccitazione}$ 333 nm, $\lambda_{emissione}$ 463 nm;
- Colonna analitica: Inertsil ODS-3V (5µm, 150 mm x 4,6 mm);
- Cartuccia di guardia: Inertsil ODS-3V (5µm, 4,0 mm x 10 mm);
- Termostato colonne: 40°C;
- Fase mobile: soluzione A (1 litro) preparata con 550 mL H_2O + 450 mL metanolo + 350 µL di acido nitrico 4M + 119 mg KBr; soluzione B (1 litro) preparato con 200 mL H_2O + 800 mL metanolo + 350 µL di acido nitrico 4M + 119 mg KBr;
- Parametri gradiente:il valore di A:B (v/v) a 0 min è 100:0, a 14 min 100:0, a 16 min 35:65, a 30 min 35:65, a 31 min 100:0 e a 40 min 100:0;
- Velocità di flusso: 0,8 mL/min;
- Derivatizzazione: AFB_1 e AFG_1 sono derivatizzate tramite Kobra Cell impostata a 100 µA;
- Capacità: 200 ng di Aflatossine totali e 500 ng di OTA (recupero>70%);
- LOD (*Limit of Detection*): 0,001ng di campione iniettato per ciascuna delle 4 AF e 0,008 ng per OTA;
- LOQ (*Limit of Quantification*): 3 volte LOD.

Risultati

Valori di recupero ottenuti dall'estratto arricchito di 6 prodotti alimentari diversi

I risultati (Tabella 1) dimostrano l'efficienza di cattura delle 5 micotossine da parte della colonna ad immunoaffinità mentre sono esposte all'effetto matrice di campioni selezionati di cereali, spezie e frutta secca. La ripetibilità delle prestazioni della colonna è <3% per tutti i prodotti analizzati e l'HPLC si è dimostrata adatta per una quantificazione accurata di tutte e 5 le micotossine:

Tabella 1. Recuperi medi (n=6) su campioni di estratti di matrici reali

Tipo di matrice	Livello di arricchimento (µg/kg)		Recupero medio (%)					% RSD*
	AF	OTA	AFB_1	AFB_2	AFG_1	AFG_2	OTA	
Mais	10	3	102,6	107,5	100,8	100,8	98,3	0,6-2,4
Grano	4	3	106,9	108,3	104,4	104,3	99,8	1,8-3,2
Pepe nero	10	15	95,6	95,8	90,3	86,2	87,7	1,2-2,9
Paprika	40	50	106,6	102,9	97,7	89,2	92,8	0,8-1,7
Uva sultanina	10	10	96,5	97,4	91,9	89,0	94,5	0,7-1,5
Fichi secchi	10	10	96,3	95,5	91,9	87,0	87,3	0,5-1,7

*Relative Standard Deviation

Valori di recupero ottenuti dalle matrici arricchite di 6 prodotti alimentari diversi

I risultati e i valori di ripetibilità ottenuti per i 6 prodotti alimentari testati, sono in linea con le raccomandazioni europee relative ai valori di recupero (>70% e <110%) e al RSD (<30%) per l'analisi delle AF totali e dell'OTA. I risultati dimostrano l'efficienza del protocollo di preparazione del campione per estrarre le tossine dalle diverse matrici oltre alla capacità delle colonne ad immunoaffinità di catturare le 5 tossine quando sono esposte a campioni di estratti diluiti.

Tabella 2. Recuperi medi (n=6) su campioni di matrici reali

Tipo di matrice	Livello di arricchimento (µg/kg)		Recupero medio (%)					% RSD
	AF	OTA	AFB_1	AFB_2	AFG_1	AFG_2	OTA	
Mais	10	3	86,5	93,1	86,3	87,4	102,5	3,7-5,5
Grano	4	3	100,8	104,4	104,3	105,9	104,4	1,2-3,4
Pepe nero	10	15	88,1	90,3	81,2	79,0	90,6	2,6-4,4
Paprika	40	50	92,5	94,9	98,1	91,0	81,0	0,7-2,3
Uva sultanina	4	10	84,3	84,8	77,1	78,0	87,9	2,6-3,8
Fichi secchi	10	10	86,2	85,4	83,9	81,5	93,7	4,0-5,2

Valori di recupero ottenuti da campioni FAPAS

Per tutti i materiali di riferimento FAPAS (Tabelle 3 e 4) il quantitativo di tossine recuperato è entro i limiti accettabili per le 5 tossine singole e per le AF totali.

Tabella 3. Risultati dell'applicazione del metodo per la determinazione di OTA per i materiali di riferimento del circuito FAPAS

Matrice (codice circuito)	Intervallo FAPAS (µg/kg)	AFLAOCHRA PREP® (µg/kg)	% RSD (µg/kg)
Succo di uva sultanina (T1760)	5,31-13,66	11,1	0,6
Paprika (T1763)	11,90-30,70	28,5	0,3

Tabella 4. Risultati dell'applicazione del metodo per la determinazione di AF per i materiali di riferimento del circuito FAPAS

Matrice (codice circuito)	Micotossina	Intervallo FAPAS (µg/kg)	AFLAOCHRA PREP® (µg/kg)	% RSD (µg/kg)
Mais (FAPAS T041025)	AFB_1	2,92-7,50	5,06	0,7
	AFB_2	1,27-3,26	2,38	0,4
	AFG_1	1,30-3,35	2,14	0,9
	AFG_2	0,55-1,41	0,88	2,3
	AF totali	6,0-15,4	10,05	0,7
Frutta secca (FAPAS T04116)	AFB_1	2,51-6,47	4,89	4,6
	AFB_2	0,81-2,09	1,79	2,9
	AFG_1	1,32-3,39	2.42	3,1
	AFG_2	0,46-1,18	0,89	3,2
	AF totali	5,09-13,09	9,99	3,8

Conclusioni

Le colonne AFLAOCHRA PREP® consentono l'isolamento e la determinazione quantitativa delle AF totali e dell'OTA utilizzando un unico metodo di preparazione del campione e una singola impostazione delle condizioni per l'HPLC. Questo porta ad avere un maggiore volume di campione, oltre ad una riduzione dei materiali di consumo, dei reagenti e dei relativi costi. Le prestazioni delle colonne AFLAOCHRA PREP®, per quanto riguarda la percentuale di recupero e la ripetibilità, sono in linea con le normative europee. AFLAOCHRA PREP® forniscono un metodo rapido e robusto adatto per una vasta gamma di materie prime (cereali, frutta secca e spezie) e consentono una quantificazione accurata e a bassi livelli (<2 μg/kg) delle 5 tossine.

FUMONISINE B_1 E B_2 IN PRODOTTI ALIMENTARI A BASE DI MAIS: OTTIMIZZAZIONE E VALIDAZIONE DEL METODO ANALITICO MEDIANTE HPLC-FLD CON DERIVATIZZAZIONE CHIMICA POST-COLONNA E MONITORAGGIO SU CAMPIONI REALI

Sonia Lo Magro (a), Donatella Nardiello (a), Maria Campaniello (a), Marco Iammarino (a), Carmen Palermo (b), Marilena Muscarella (a)
(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia
(b)Dipartimento di Scienze Agro-Ambientali, Chimica e Difesa Vegetale, Università degli Studi, Foggia

Introduzione

Le Fumonisine sono micotossine prodotte dal metabolismo di funghi appartenenti al genere *Fusarium*, in particolare *F.moniliforme* e *F.proliferatum*, contaminanti diffusi del mais e altri cereali tra cui sorgo e riso (1-3). Tra le numerose forme di Fumonisine finora identificate negli alimenti contaminati vengono, generalmente, rinvenute quelle di tipo B (FB_1, FB_2 e FB_3). Nel 2002 l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) ha classificato la FB_1 nel gruppo 2B, quale potenziale agente cancerogeno per l'uomo (4). La maggiore diffusione e tossicità della FB_1 e la minore concentrazione della FB_3 consentono di semplificare le indicazioni legislative riferendo i valori soglia, fissati nel Reg. CE 1126/2007 (5), per il granoturco e i prodotti da esso derivati, alla sola somma di FB_1 e FB_2. Poiché le Fumonisine possono essere presenti sia nella granella sintomatica che in quella sana, asintomatica, il controllo della contaminazione da Fumonisine nel mais è diventato un argomento prioritario nelle ricerche inerenti la sicurezza alimentare, in linea con le direttive indicanti i livelli massimi di Fumonisine negli alimenti per l'uomo (5) e per quelli destinati al settore zootecnico (6). La tecnica più adoperata per la determinazione delle Fumonisine è la cromatografia liquida con rivelazione fluorimetrica, più affidabile delle tecniche immunoenzimatiche (7) contraddistinte da problemi di cross-reattività e inadeguatezza nella quantificazione delle singole Fumonisine. Essa, inoltre, risulta essere caratterizzata da una maggiore rapidità e facilità di utilizzo rispetto alle tecniche cromatografiche abbinate alla spettrometria di massa (8) che, pur offrendo sensibilità elevate, richiedono una strumentazione costosa e sofisticata. La rivelazione in fluorescenza delle Fumonisine, tuttavia, necessita di processi di derivatizzazione pre-colonna che presentano limitazioni dovute a scarsa sensibilità, effetti matrice, utilizzo di agenti tossici e basse cinetiche di reazione.

Nel presente lavoro è descritta l'ottimizzazione e la validazione di un metodo analitico sensibile e selettivo per la determinazione delle Fumonisine in prodotti alimentari a base di mais, basato sulla cromatografia liquida a fase inversa e la rivelazione fluorimetrica degli addotti fluorescenti formati per reazione post-colonna delle Fumonisine con *o*-ftalaldeide (OPA) e N,N-dimetil-2-mercaptoetilammina (Thiofluor™) (9). La derivatizzazione post-colonna consente di eliminare i problemi legati alla necessità di operare rapidamente tra il processo di derivatizzazione delle Fumonisine, i cui addotti hanno una vita media di pochi minuti, e l'iniezione in colonna. In tal modo si garantisce un aumento della riproducibilità della metodica di analisi che diventa facilmente gestibile e suscettibile di automazione.

I requisiti del metodo analitico, indicati nel Reg. CE 882/2004 (10), sono stati verificati tramite una procedura di validazione condotta integrando quanto specificato nel Reg. CE 401/2006 (11) con i protocolli riportati nella Decisione 657/2002/CE (12) e seguendo le indicazioni descritte nella linea guida degli IZS per la validazione intra-laboratorio dei metodi di conferma per la determinazione di micotossine.

Il metodo analitico, ottimizzato e validato, è stato, infine, adottato per condurre un monitoraggio sulla presenza di Fumonisine in 100 prodotti alimentari a base di mais (8 di farina di mais, 21 di polenta, 7 di mais, 35 di corn-flakes, 16 di snack e 13 di prodotti per celiaci), acquistati negli anni 2007-2008 in diversi punti vendita della Puglia e della Basilicata.

Materiali e metodi

Reagenti

Gli standard di FB_1 e FB_2 e cloruro di sodio, cloruro di potassio, fosfato bibasico di sodio monoidrato, fosfato monobasico di potassio sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Steinheim, Germania), metanolo, acetonitrile, acqua per HPLC da Baker (Deventer, Olanda), *o*-ftalaldeide, Thiofluor™, tampone diluente di borato di potassio OD104 da Pickering Laboratories (USA), e colonnine ad immunoaffinità FUMONIPREP® da R-Biopharm Rhône Ltd.

Apparecchiatura

È stato utilizzato un cromatografo liquido Agilent Technologies SL 1200 Series (Waldbronn, Germania) corredato di rivelatore fluorimetrico (modello G1321A) e di un dispositivo per la derivatizzazione chimica post-colonna (LabService Analytica Srl, Anzola Emilia, BO, Italia).

La colonna cromatografica scelta è stata la ZORBAX Eclipse® XDB-C18 (Agilent Technologies), di dimensioni 150 mm×4,6 mm con particelle di 5 µm.

Le condizioni cromatografiche ottimizzate sono riportate nella Tabella 1.

Tabella 1. Condizioni sperimentali ottimizzate

Parametro	Ottimizzazione del parametro
Fase mobile	Eluizione in gradiente a base di: A) Tampone Fosfato 0,1 M, pH 3,15; B) CH_3OH
Flusso	0,8 mL/min
Volume di iniezione	100 µL
Temperatura colonna	40°C
Derivatizzazione	post-colonna mediante OPA/Thiofluor™; F: 0,4 mL/min
Temperatura di derivatizzazione	40°C
Rivelazione fluorimetrica	$\lambda_{eccitazione}$: 343 nm; $\lambda_{emissione}$: 445 nm

Preparazione del campione

5 g di campione macinato sono trattati con 2 x 12,5 mL di una miscela di acetonitrile/metanolo/acqua (30/30/40) per l'estrazione delle Fumonisine. Dopo sonicazione e centrifugazione a 3500 rpm, 2 mL del filtrato, aggiunti a 8 mL di PBS (*Phosphate Buffered*

Saline), vengono purificati mediante colonnine ad immunoaffinità (IAC), contenenti anticorpi monoclonali immobilizzati. Dopo lavaggio con 10 mL di PBS, le FB_1 e FB_2 sono eluite con 4 mL di CH_3OH. Dopo evaporazione dell'eluato sotto flusso di azoto a 40°C, il residuo è ricostituito in fase mobile: CH_3OH/0,1M tampone fosfato a pH 3,15 (60:40, v:v) ed, infine, filtrato su membrane Anotop 10 LC (0,2 µm, 10 mm, Whatman).

Risultati e discussione

Il metodo da noi proposto si basa su un processo automatizzato di derivatizzazione post-colonna mediante OPA e Thiofluor™. In tal modo gli addotti di derivatizzazione vengono inviati rapidamente al rivelatore fluorimetrico, consentendo di eliminare i problemi legati alla necessità di operare rapidamente e garantendo un aumento della riproducibilità della metodica di analisi. Per il processo di derivatizzazione chimica post-colonna, è stato utilizzato un semplice dispositivo, disponibile sul mercato, costituito da una pompa a doppio pistone collegata ad una riserva di agente derivatizzante e una camera di reazione termostatata (LabService Analytica Srl). La combinazione di una semplice procedura di *clean-up* con la derivatizzazione chimica post-colonna e la rivelazione fluorimetrica consente di ottenere una elevata affidabilità e sensibilità di analisi, con limiti di rivelazione inferiori a 15 µg/kg (Tabella 2).

Tabella 2. Curve di taratura di FB_1 e FB_2 valutate su soluzioni standard e in matrice

	$y^a = a + bx^b$ (valutata su soluzioni standard di Fumonisine)				
	a ± SD	b ± SD	r^c	LOD µg/L	LOQ µg/L
FB_1	− 0,3 ± 0,6	0,454 ± 0,003	0,9998	4	13
FB_2	− 1,0 ± 0,6	0,375 ± 0,003	0,9997	5	16
	$y^a = a + bx^d$ (valutata su campioni di cornflakes additivati)				
				µg/kg	µg/kg
FB_1	2,9 ± 1,2	0,32 ± 0,02	0,9955	12	37
FB_2	1,6 ± 0,9	0,19 ± 0,02	0,9929	15	46

[a] y è il segnale in unità di luminescenza (LU). [b] x è valore della concentrazione in µg/L. [c] Coefficiente di correlazione. [d] Valori di concentrazione in µg/kg.

Una serie di parametri sperimentali sono stati attentamente studiati al fine di definire le migliori condizioni di separazione cromatografica e di rivelazione. L'influenza del tipo di colonna separativa (caratteristiche della fase stazionaria, diametro interno e dimensioni delle particelle di impaccamento), della composizione e del flusso di fase mobile è stata valutata su miscele standard di FB_1 e FB_2 e successivamente è stata verificata su matrici alimentari a base di mais di vario tipo (fiocchi di mais, biscotti, gallette, farine e polenta). Sono state ottimizzate, inoltre, le condizioni di rivelazione fluorimetrica variando la velocità di flusso di agente derivatizzante in funzione del flusso di fase mobile e sono state definite le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione associate ad una maggiore intensità del segnale. In Figura 1 è riportato il profilo cromatografico, ottenuto nelle condizioni ottimali di separazione e rivelazione, di una miscela standard delle Fumonisine B_1 e B_2 e di un campione di polenta, naturalmente contaminato.
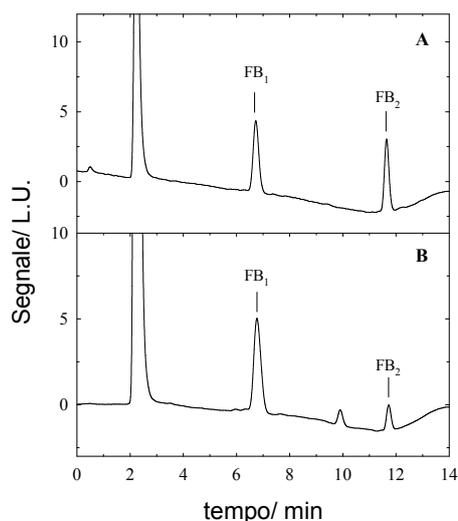
Figura 1. Cromatogrammi di una soluzione standard (concentrazione 160 µg/L) di FB_1 e FB_2 (A) e di un campione di polenta naturalmente contaminato (B)

Il metodo ottimizzato è stato validato integrando il Reg. CE 401/2006 (11) con i protocolli europei in materia di validazione (10, 12) e seguendo le indicazioni riportate nella linea guida degli IZS per la validazione intra-laboratorio dei metodi di conferma per la determinazione di micotossine. Sono state valutate le performance analitiche quali specificità, linearità, ripetibilità, recupero, limite di rivelazione (*Limit of Detection*, LOD) e quantificazione (*Limit of Quantification*, LOQ). È stata verificata la rispondenza dei requisiti analitici (Tabella 3) ai criteri previsti dal Reg. CE 401/2006 (11), confermando l'applicabilità del metodo alla determinazione del tenore di Fumonisine nei prodotti alimentari.

Tabella 3. Parametri di validazione valutati (recuperi e Relative Standard Deviation, RSD) su campioni di cornflakes additivati

Fumonisina	Livello di contaminazione (µg/kg)	Recupero % (valore medio ± SD)	RSD (%)	
			Intra-day (n.=6)	*Inter-day (n.=12)*
B_1	100	94,2 ± 6,8	3,4	7,2
	200	89,3 ± 6,9	3,7	7,7
	300	87,0 ± 2,4	1,9	2,7
	400	76,5 ± 8,4	4,1	11
B_2	100	71,4 ± 6,5	4,7	9,1
	200	74,8 ± 6,2	4,5	8,3
	300	69,9 ± 3,3	2,3	4,6
	400	66,8 ± 4,9	3,6	7,0

Il contenuto di Fumonisine, determinato in 100 prodotti alimentari a base di mais ed espresso come somma di FB_1 + FB_2, è riportato nelle Figure 2 e 3, in funzione delle diverse tipologie di campione. Con LM è indicato il limite massimo consentito, attualmente in vigore per le Fumonisine (5), pari a 1000 µg/kg nei prodotti alimentari a base di mais destinato al consumo umano diretto e 800 µg/kg nei cereali da colazione e nelle merende.
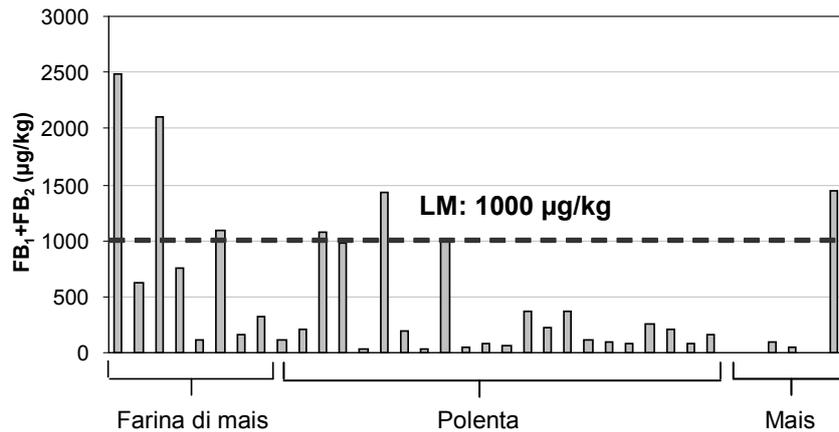
Figura 2. Contenuto di Fumonisine valutato negli anni 2007 e 2008 in 8 campioni di farina di mais, in 21 campioni di polenta e in 7 campioni di mais
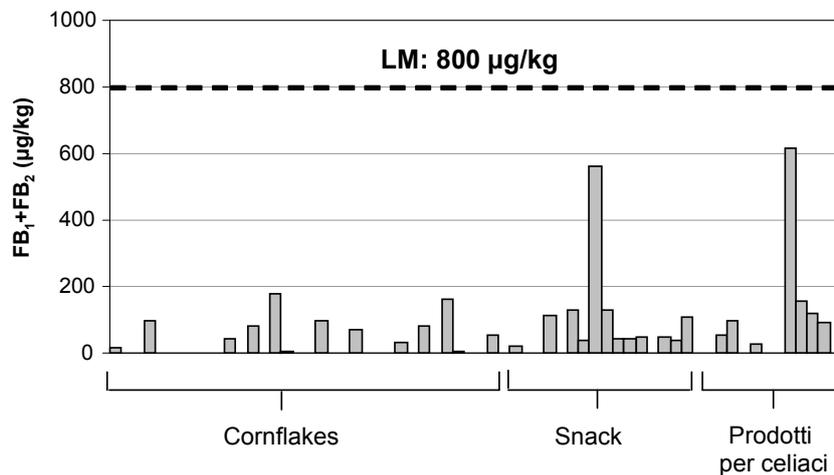
Figure 3. Contenuto di Fumonisine valutato negli anni 2007 e 2008 in 35 campioni di cornflakes, in 16 snack e in 13 prodotti per celiaci

I risultati dell'indagine sulla presenza delle Fumonisine sono riassunti nella Tabella 4, dove è mostrata sia la percentuale di campioni contaminati (ad una concentrazione superiore al limite di rivelazione del metodo, pari a 12 µg/kg per FB_1 e 15 µg/kg per FB_2), sia la percentuale di campioni non conformi.

Dall'indagine eseguita è emersa la presenza delle Fumonisine in misura variabile in tutte le matrici analizzate. Le FB_1 e FB_2 sono state riscontrate in concentrazioni superiori al limite di rivelazione in tutti i campioni di polenta e di farina di mais, in 4 campioni di mais, in 10 di cornflakes, in 12 di snack e in 7 di prodotti per celiaci (pasta, gallette, biscotti).

Tabella 4. Contaminazione di FB_1 e FB_2 nelle matrici reali

Tipo di matrice	Campioni (n.)	% Contaminazione (c > 15 µg/kg)	% Campioni positivi	Range[a] (µg/kg)	Media[a] (µg/kg)
Polenta	21	100	19	27-1433	330
Farina di mais	8	100	38	119-2481	960
Mais	7	57	14	41-1441	430
Cereali da colazione	35	29	-	35-178	89
Snack	16	75	-	22-561	110
Alimenti per celiaci	13	54	-	28-618	170

[a] Valori riferiti ai soli campioni contaminati (c > 15 µg/kg)

Livelli di contaminazione superiori ai limiti consentiti sono stati osservati in 4 campioni di polenta, in 3 di farina di mais e in 1 di mais, mentre non sono stati rilevati campioni positivi tra cereali da colazione, snack e alimenti per celiaci. Una minore incidenza di contaminazione è stata osservata nell'anno 2008 (7%) rispetto al 2007 (19%). Il differente grado di contaminazione delle varie matrici analizzate può essere attribuito al tipo di processo adoperato in fase di produzione. In particolare, i trattamenti meccanici e i blandi processi di riscaldamento, effettuati su polenta e farina di mais, non riducono significativamente il contenuto di Fumonisine eventualmente presente nel mais di partenza. I processi di tostatura ed estrusione, a cui sono sottoposti i cornflakes, gli snack e gli alimenti per celiaci, determinano, invece, un decremento significativo del tenore di Fumonisine. Tale riduzione varia dal 30%, per il solo processo di estrusione, al 60-70% per il processo completo di estrusione e tostatura (13). Per questi prodotti è stata riscontrata una minore incidenza di contaminazione e l'assenza di positività. Tra i campioni analizzati, quelli provenienti da agricoltura biologica hanno presentato una maggiore percentuale di contaminazione da Fumonisine.

Conclusioni

Nel presente lavoro di ricerca è stato messo a punto e ottimizzato un metodo analitico, rapido, sensibile e automatizzato per la determinazione delle FB_1 e FB_2 in prodotti alimentari destinati al consumo umano. Il metodo è basato sulla cromatografia liquida ad alte prestazioni abbinata alla rivelazione fluorimetrica previa derivatizzazione chimica post-colonna mediante *o*-ftalaldeide e Thiofluor™. Il metodo ottimizzato si è dimostrato semplice, affidabile e altamente sensibile e consente di ottenere una elevata riproducibilità di analisi.

La validazione eseguita in accordo con quanto definito nel Reg. CE 822/2004, ha dimostrato la rispondenza dei requisiti analitici del metodo ai criteri previsti nel Reg. CE 401/2006, confermandone l'affidabilità nella valutazione della contaminazione da Fumonisine nei prodotti alimentari a base di mais nelle analisi di controllo ufficiale. Dall'indagine svolta sui 100 prodotti alimentari è emerso che il 54% dei campioni analizzati risulta contaminato da Fumonisine ad un livello maggiore del LOD (15 µg/kg), ma inferiore al limite legale, espresso come somma FB_1+ FB_2. Soltanto tra mais, polenta e farina di mais, si riscontrano campioni non conformi (C > 1000 µg/kg) con percentuali variabili nell'intervallo 14-38%.

Bibliografia

1. Gelderblom WCA, Jaskiewicz K, Marasas WFO, Thiel PG, Horak MJ, Vleggaar R. Fumonisins-novel-mycotoxins with cancer promoting activity produced by Fusarium monoliforme. *Applied and Environmental Microbiology* 1998;54:1806-11.
2. Trucksess MW. Mycotoxins. *The Journal of AOAC International* 2001;84:202-11.
3. Shephard GS. Chromatographic determination of the Fumonisins mycotoxins. *The Journal of Chromatography A* 1998;815:31-9.
4. World Health Organizatiopn; International Agency for Research on Cancer. *IARC monograph on the evaluaion of carcinogenic risk to humans*. *Volume 82. Some tradiiotnal herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*. Lyon, France: IARC Press; 2002.
5. Unione Europea. Regolamento CE N.1126/2007 della Commissione del 28 settembre 2007, che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le Fusarium-tossine nel granoturco e nei prodotti a base di granoturco. *GUCE* L255, 29 settembre 2007.
6. Unione Europea. Raccomandazione 2006/576/CE della Commissione del 17 agosto 2006 sulla presenza di deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali. *GUCE* L229, 23 agosto 2006.
7. Castells M, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ. Distribution of Fumonisins and aflatoxins in corn fractions during industrial cornflake processing. *International Journal of Food Microbiology* 2008;123:81-7.
8. Zöllner P, Mayer-Helm B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *The Journal of Chromatography A* 2006;1136:123-69.
9. Muscarella M, Lo Magro S, Nardiello D, Palermo C, Centonze D. Development of a new analytical method for the determination of Fumonisins B1 and B2 in food products based on high performance liquid chromatography and fluorimetric detection with post-column derivatization. *The Journal of Chromatography A* 2008;1203:88-93.
10. Unione Europea. Regolamento (CE) 882/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali. *GUCE* L 191, 30 aprile 2004.
11. Unione Europea. Regolamento (CE) N. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *GUCE* L70/12, 9 marzo 2006.
12. Unione Europea. Decisione 2002/657/CEE della Commissione del 12 Agosto 2002 che attua la Direttiva 96/23/CEE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati. *GUCE* L221, 17 agosto 2002.
13. Soriano JM, Dragacci S. Occurence of Fumonisins in foods. *Food Research International* 2004;37:985-1000.

Ringraziamenti

Lavoro eseguito con i fondi di ricerca corrente del Ministero della Salute (Progetto RC–IZS PB 004/07). Si ringrazia P. D'Antini (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia) per la collaborazione tecnica.

AFLATOSSINE B_1, B_2, G_1 E G_2 IN PRODOTTI ALIMENTARI E ALIMENTI PER USO ZOOTECNICO: VALIDAZIONE DEL METODO DI CONFERMA HPLC CON DERIVATIZZAZIONE FOTOCHIMICA ONLINE E RIVELAZIONE FLUORIMETRICA

Marilena Muscarella (a), Marco Iammarino (a), Donatella Nardiello (a), Sonia Lo Magro (a),
Carmen Palermo (b), Diego Centonze (b)
(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia
(b) Dipartimento di Scienze Agro-Ambientali, Chimica e Difesa Vegetale, Università degli Studi, Foggia

Introduzione

Le Aflatossine (AF) sono metaboliti secondari prodotti dai funghi *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Sono state identificate almeno 17 differenti forme e tra di esse le Aflatossine B_1, B_2, G_1 e G_2 sono considerate le più pericolose, manifestando proprietà di genotossicità, cancerogenità e immunotossicità (1-3). Le Aflatossine sono responsabili della contaminazione di vari alimenti di origine vegetale fra i quali cereali, semi oleaginosi, frutta a guscio, frutta secca, alimenti per l'infanzia e mangimi (4). Le AF appartengono alla categoria B dell'allegato 1 della Direttiva 23/1996/CE (5) e, come prescritto dal Reg. CE 1881/2006 (6), per tali sostanze è stato fissato un valore di livello massimo consentito nei prodotti alimentari destinati al consumo umano diretto pari a 2 µg/kg per l'Aflatossina B_1 e 4 µg/kg per le Aflatossine totali (AFB_1+AFB_2+AFG_1+AFG_2). Per l'alimentazione animale, il DL.vo n. 149/2004 (7), in conformità con la Direttiva 100/2003/CE (8), stabilisce per l'AFB_1 un contenuto massimo nelle materie prime per i mangimi di 0,02 mg/kg e limiti variabili nell'intervallo 0,005-0,02 mg/kg per i prodotti destinati all'alimentazione degli animali.

Tra i numerosi metodi riportati in letteratura per la determinazione delle AF nei prodotti alimentari (metodi immunoenzimatici, metodi cromatografici con derivatizzazione chimica pre- o post-colonna o derivatizzazione elettrochimica online), la separazione a fase inversa abbinata alla rivelazione fluorimetrica con derivatizzazione fotochimica post-colonna risulta economica e di semplice utilizzo e garantisce un'elevata riproducibilità di analisi, senza necessità di controllo della reazione di derivatizzazione. Inoltre tale metodo analitico risulta rapido e altamente sensibile e consente di quantificare separatamente le diverse Aflatossine, requisito indispensabile quando è necessario accertare il livello della sola AFB_1, come nel caso degli alimenti per uso zootecnico. Nel presente lavoro è riportata la procedura di validazione del metodo analitico *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) con derivatizzazione fotochimica post-colonna per la determinazione delle AFB_1, AFB_2, AFG_1 e AFG_2 nei prodotti alimentari e nelle materie prime per mangimi (9). I requisiti del metodo analitico sono stati verificati tramite una procedura di validazione, eseguita in accordo con quanto definito nel Reg. CE 882/2004 (10), che consente di integrare il Reg. CE 401/2006 (11) con i protocolli europei in materia di validazione, riportati nella Decisione 657/2002 (12).

Materiali e metodi

Reagenti

Metanolo, acetonitrile, acqua per HPLC sono satti acquistati dalla Baker (Deventer, Olanda), cloruro di sodio, cloruro di potassio, fosfato bibasico di sodio monoidrato, fosfato monobasico di potassio e TWEEN 20® dalla Sigma–Aldrich (Germania), colonnine ad immunoaffinità AflaCLEAN™ da LCTech GmbH (Dorfen, Germania).

Le soluzioni standard delle AFB_1, AFB_2, AFG_1 e AFG_2 sono state acquistate dalla Riedel-de Haën (Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze, Germania).

Apparecchiatura

L'apparecchiatura utilizzata è stata un cromatografo liquido Agilent Technologies SL 1200 Series (Waldbronn, Germania) corredato di rivelatore fluorimetrico (modello G1321A) e di un dispositivo per la derivatizzazione fotochimica online UVETM (LCTech GmbH, Dorfen, Germania).

La colonna cromatografica scelta è stata la ZORBAX Eclipse® XDB-C18 (Agilent Technologies), di dimensioni 150 mm×4,6 mm con particelle di 5 µm.

Le condizioni cromatografiche ottimizzate sono riportate nella Tabella 1.

Tabella 1. Condizioni sperimentali ottimizzate

Parametro	Ottimizzazione del parametro
Fase Mobile	$H_2O/CH_3CN/\ CH_3OH$, 55:15:30
Flusso	1,0 mL/min
Volume di iniezione	20 µL
Temperatura colonna	40°C
Derivatizzazione	Fotochimica: $\lambda_{derivatizzazione}$ = 254 nm
Rivelazione fluorimetrica	$\lambda_{eccitazione}$: 365 nm; $\lambda_{emissione}$: 435 nm

Preparazione del campione

15 g di campione macinato sono trattati con 30 mL di una soluzione metanolo/acqua 80:20 per l'estrazione delle Aflatossine. Dopo agitazione con vortex e filtrazione, 2 mL dell'estratto, aggiunti a 8 mL di PBS (*Phosphate Buffered Saline*), vengono purificati mediante colonnine ad immunoaffinità, contenenti anticorpi monoclonali immobilizzati (AflaCLEAN™, 3 mL).

Dopo lavaggio con 10 mL di acqua, le Aflatossine vengono eluite con 2 mL di CH_3OH. Dopo evaporazione dell'eluato sotto flusso di azoto a 40°C, il residuo è ricostituito in fase mobile ($H_2O/\ CH_3CN/\ CH_3OH$, 55:15:30) ed, infine, filtrato su membrane Anotop 10 LC (0,2 µm, 10 mm, Whatman).

Risultati e discussione

In Figura 1 è mostrato il confronto tra il profilo cromatografico di una soluzione standard delle Aflatossine alla concentrazione totale di 2,5 µg/kg e di un campione di mandorle additivato con AFB_1 e AFG_1 a 2,0 µg/kg e AFB_2 e AFG_2 a 0,5 µg/kg.
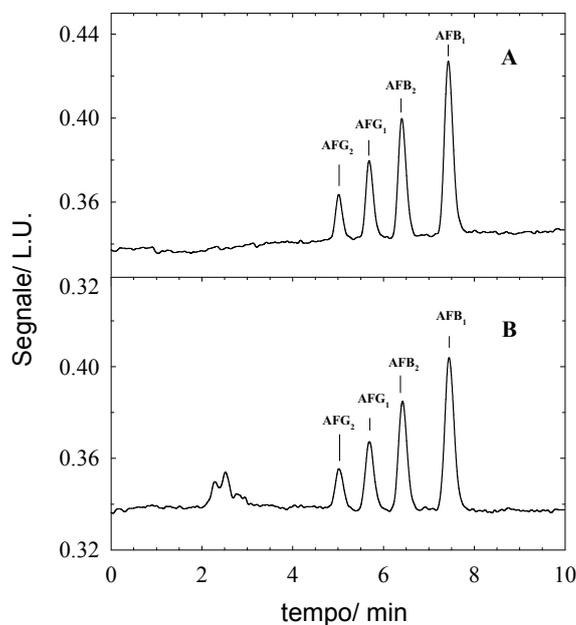
Figura 1. Cromatogrammi di una soluzione standard delle Aflatossine alla concentrazione totale di 2,5 µg/kg (A) e di un campione di mandorle fortificato con AFB_1 e AFG_1 a 2,0 µg/kg e con AFB_2 e AFG_2 a 0,5 µg/kg (B)

L'HPLC con rivelazione a fluorescenza può essere adoperata come metodo quantitativo di conferma per la determinazione delle Aflatossine, purché i requisiti del metodo soddisfino quanto indicato nel Reg. CE 401/2006 (11). Tale normativa individua i criteri di precisione e di accuratezza da soddisfare e definisce, con il Reg. CE 882/2004 (10), i parametri di prestazioni del metodo da valutare.

Il metodo di analisi proposto è stato validato sia per le materie prime per mangimi (Tabella 2) che per i prodotti alimentari (Tabella 3). I criteri di rendimento, valutati su 2 sedute analitiche per i primi e su 3 sedute per i secondi, a 0,5, 1 ed 1,5 il limite massimo consentito, sono risultati rispondenti a quanto definito nel Reg. CE 401/2006 (11).

Tabella 2. Campioni di grano duro (mangime): riproducibilità intra-laboratorio e recupero delle Aflatossine

Aflatossina	Livello di additivazione (µg/kg)	Recupero % (valore medio ± SD)	RSD (n.=12) (%)
B_1	10	75,7 ± 6,3	9,6
	20	74,3 ± 4,7	7,2
	30	72,6 ± 3,9	5,5

Tabella 3. Campioni di semola di grano: riproducibilità intra-laboratorio e recupero delle AF

Aflatossina	Livello di additivazione (µg/kg)	Recupero % (valore medio ± SD)	RSD %	
			Intra-day (n=6)	*Inter-day (n=18)*
	1	76,4 ± 6,5	3,5	9,9
B_1	2	83,0 ± 9,8	4,9	11,0
	3	92,2 ± 8,3	2,7	6,8
	0,25	79,5 ± 11,6	9,1	12,0
B_2	0,50	82,1 ± 9,9	5,9	11,0
	0,75	92,8 ± 8,0	3,1	7,6
	1	80,4 ± 9,6	7,7	14,0
G_1	2	83,4 ± 11,1	6,2	15,0
	3	94,6 ± 8,2	4,4	8,1
	0,25	89,2 ± 16,9	8,8	20,0
G_2	0,50	82,0 ± 10,7	11,0	19,0
	0,75	87,7 ± 10,1	6,6	10,0

La selettività del metodo, valutata analizzando 10 campioni per specie (grano, mandorle, pistacchi, mais e avena), ha consentito, in combinazione con le prove di robustezza, l'applicazione del metodo di analisi alle matrici sopra indicate. Infine, sia i limiti di decisione (LOD e LOQ) (Tabella 4) che i valori d'incertezza estesa relativa % per l'AFB_1 (10,1%) e per le Aflatossine totali (13,0%), garantiscono un livello di precisione adeguato per l'analisi di conferma.

Tabella 4. Curve di taratura, LOD e LOQ delle Aflatossine

	$y = a + bx$ [a]				
Aflatossina	b ± SD	a ± SD	r [b]	LOD [c]	LOQ [c]
B_1	0,87 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,9998	0,04	0,11
B_2	2,31 ± 0,04	0,02 ± 0,01	0,9996	0,01	0,04
G_1	0,368 ± 0,009	0,014 ± 0,009	0,9991	0,08	0,24
G_2	0,87 ± 0,01	0,005 ± 0,004	0,9996	0,02	0,05

[a] y è il segnale espresso in unità di luminescenza (LU); x è il valore della concentrazione in µg/L. [b] Coefficiente di correlazione. [c] Valori espressi in µg/L.

Conclusioni

Nel presente lavoro è stato validato un metodo per la determinazione simultanea delle Aflatossine, basato sulla cromatografia liquida ad alte prestazioni con rivelazione fluorimetrica, previa derivatizzazione fotochimica online. La procedura di validazione, effettuata in accordo con quanto definito nel Reg. CE 882/2004, ha dimostrato la rispondenza dei requisiti del metodo ai criteri previsti dal Reg. CE 401/2006, confermandone l'affidabilità nel controllo ufficiale delle Aflatossine B e G nei prodotti alimentari e nelle materie prime per mangimi. La procedura di validazione descritta risulta particolarmente utile nel campo delle analisi multi-

residuali delle micotossine in varie matrici, per le quali sono stati stabiliti differenti limiti di legge.

Bibliografia

1. Dickens F, Jones HE. The carcinogenic action of aflatoxin after its subcutaneous injection in the rat. *British Journal of Cancer* 1963;17:691-8.
2. Bullerman LB. Significance of mycotoxins to food safety and human health. *Journal of Food Protection* 1979;42:65-86.
3. Harwig J, Munro IC. 1975. Mycotoxins of possible importance in diseases of Canadian farm animals. *Canadian Veterinary Journal* 1975;16:125-41.
4. Eaton DL, Groopman JD. *The toxicology of aflatoxins*. San Diego (CA): Academic Press; 1994.
5. Unione Europea. Direttiva 96/23/CE del Consiglio del 29 aprile 1996 concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti e che abroga le direttive 85/358/CEE e 86/469/CEE e le decisioni 89/187/CEE e 91/1664/CEE. *GUCE* L 125, 23 maggio 1996.
6. Unione Europea. Regolamento (CE) N. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *GUCE* L364/5, 20 dicembre 2006, aggiornato il 23 luglio 2008.
7. Italia. Decreto legislativo 10 maggio 2004, n. 149. Attuazione delle direttive 2001/102/CE, 2002/32/CE, 2003/57/CE e 2003/100/CE, relative alle sostanze ed ai prodotti indesiderabili nell’alimentazione degli animali. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 139, 16 giugno 2004.
8. Unione Europea. Direttiva 2003/100/CE della commissione del 31 ottobre 2003 che modifica l'allegato I della direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali. *GUCE* L285, 1 novembre 2003.
9. Muscarella M, Iammarino M., Nardiello D, Lo Magro S, Palermo C, Centonze D, Palermo D. Validation of a confirmatory analytical method for the determination of aflatoxins B_1, B_2, G_1 and G_2 in foods and feed materials by HPLC with on-line photochemical derivatization and fluorescence detection. *Food Additives & Contaminants* 2009;26:1402-10.
10. Unione Europea. Regolamento (CE) 882/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali. *GUCE* L 191, 30 aprile 2004.
11. Unione Europea. Regolamento (CE) N. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *GUCE* L70/12, 9 marzo 2006.
12. Unione Europea. Decisione 2002/657/CEE della Commissione del 12 Agosto 2002 che attua la Direttiva 96/23/CEE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all’interpretazione dei risultati. *GUCE* L221, 17 agosto 2002

Ringraziamenti

Lavoro eseguito con i fondi di ricerca corrente del Ministero della Salute (Progetto RC–IZS PB 005/06). Si ringraziano G. Battafarano e P. D’Antini (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia) per la collaborazione tecnica.

ANALISI DELL'AFLATOSSINA B_1 IN ALIMENTI ZOOTECNICI CONTENENTI SEQUESTRANTI

Amedeo Pietri, Antonio Gallo, Terenzio Bertuzzi, Silvia Rastelli, Francesco Masoero, Gianfranco Piva
Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

Introduzione

Per l'analisi delle Aflatossine (AF), numerosi studi sono stati condotti per valutare l'efficienza di estrazione di alcuni solventi, come metanolo, acetone e acetonitrile; in particolare sono stati considerati i rapporti solvente-acqua (volume solvente/volume acqua), miscela-campione (volume miscela/pesata campione) e le interferenze dovute alla natura del campione (effetto matrice).

I metodi più comunemente usati dai laboratori specializzati prevedono un'estrazione con metanolo:acqua (80+20 v/v) o, seguendo il metodo AOAC, con acetone:acqua (85+15 v/v) (1, 2). Entrambi effettuano la successiva determinazione mediante *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), dopo purificazione attraverso colonna di immunoaffinità. Alcuni autori hanno osservato che la presenza di alcuni sequestranti, aggiunti agli alimenti zootecnici contaminati per ridurre l'escrezione di Aflatossina M_1 (AFM_1)nel latte, può ridurre il recupero percentuale nell'analisi delle AF. Questi additivi, al momento, non sono autorizzati a livello europeo per questo scopo, essi sono però abitualmente aggiunti ai mangimi come ingredienti o antiagglomeranti per aumentare l'efficienza della pellettatura.

L'obiettivo del lavoro è stato quello di esaminare se l'aggiunta di alcuni dei più comuni sequestranti può influenzare l'efficienza delle miscele di estrazione più usate.

Materiali e metodi

Preparazione dei mangimi

Due mangimi, contaminati da Aflatossina B_1 (AFB_1) a due diversi livelli, sono stati preparati utilizzando due farine di mais naturalmente contaminate (10,21 e 32,9 µg/kg di AFB_1), una crusca di frumento (1,4 µg/kg) e una farina di soia (1,11 µg/kg); gli altri ingredienti sono stati farine d'orzo e di girasole non contaminate, minerali e vitamine. Entrambi i mangimi, dopo accurata miscelazione, sono stati divisi in 54 sottocampioni. Ognuno di questi è stato miscelato con uno dei nove sequestranti considerati: 4 argille (sodio bentonite, calcio bentonite, zeolite e caolinite), 1 a base di pareti di lievito, 1 carbone attivo e 3 prodotti commerciali (Atox, Myco AD AZ e Nova™ plus).

L'aggiunta ai mangimi è stata effettuata a due diversi livelli: 1 e 2%. Per ogni livello e ogni sequestrante sono stati preparati 3 replicati. Inoltre, un altro mangime e un campione di mais naturalmente contaminati, sono stati miscelati, dopo omogeneizzazione, con ATOX al 2%.

Analisi delle Aflatossine

Le AF sono state estratte, agitando per 45 minuti, da 25 g di campione con 250 mL delle seguenti miscele: CH_3OH:H_2O (80+20 v/v), acetone:H_2O (85+15 v/v), acetone:H_2O (70+30 v/v), acetone:H_2O (60+40 v/v), acetone:H_2O (50+50 v/v).

L'estratto è stato filtrato su filtro di carta, quindi 5 mL di filtrato sono stati diluiti con 50 mL di H_2O distillata e fatti passare su colonna di immunoaffinità. La colonna è stata lavata con 5 mL di H_2O distillata, quindi le AF sono state eluite in provetta graduata con 2,5 mL di metanolo.

Dopo concentrazione con flusso di N_2, l'estratto purificato è stato portato a 2 mL con la miscela acetonitrile:H_2O (25+75 v/v), utilizzando un bagno ad ultrasuoni; la soluzione è stata miscelata, filtrata (0,45 µm) e sottoposta ad analisi mediante HPLC. Per la separazione delle AF è stata utilizzata una colonna RP-18 Superspher (Merck), con fase mobile H_2O:metanolo:acetonitrile (64+23+13 v/v) a flusso 0,5 mL/min.; la rivelazione fluorimetrica è stata effettuata ($\lambda_{eccitazione}$=365 nm e $\lambda_{emissione}$=440 nm) dopo derivatizzazione fotochimica post colonna.

Risultati e discussione

Le percentuali di recupero per le diverse miscele di estrazione sono state valutate aggiungendo 0,5 mL di una soluzione standard di AFB_1 (250 µg/L) a 25 g di un mangime non contaminato da AF e senza aggiunta di sequestranti, in modo da avere una contaminazione di 5,0 µg/kg. Per ogni miscela estraente sono stati effettuati tre replicati. Le percentuali di recupero medie sono state superiori al 95% per tutte le miscele di estrazione.

È stato analizzato anche un campione di mais di riferimento certificato (r-Biopharm Rhône) con una contaminazione dichiarata di 4,1 µg/kg; i risultati medi (tre replicati per estrazione) sono stati 4,2 µg/kg per la miscela con metanolo e 4,3 per quelle con acetone. I limiti di rivelazione (*Limit of Detection*, LOD) e di quantificazione (*Limit of Quantification*, LOQ) sono stati rispettivamente di 0,02 e 0,05 µg/kg.

Considerando i mangimi senza sequestranti, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i metodi di estrazione metanolo:H_2O (80:20 v/v) e acetone:H_2O (85:15 v/v), anche se livelli più elevati si sono trovati utilizzando l'estrazione con acetone. In particolare, per il mangime a maggiore contaminazione sono stati trovati valori medi di 13,8±1,0 e 15,3±1,2 µg/kg, rispettivamente usando l'estrazione metanolo:H_2O (80:20 v/v) e acetone:H_2O (85:15 v/v); per quello a minore contaminazione valori di 7,0±0,6 e 7,5±0,6 µg/kg, rispettivamente.

Notevoli differenze sono state riscontrate per i mangimi contenenti sequestranti (Tabelle 1 e 2); per tutti i campioni, i risultati evidenziano un'efficienza di estrazione molto scarsa della miscela metanolo:H_2O (80:20 v/v), con percentuali di recupero inferiori al 25%. Usando la miscela acetone:H_2O (85:15 v/v), la percentuale media di recupero è stata del 75% per i mangimi a livello maggiore e dell'84% per quelli a livello minore di AFB_1. L'efficienza di estrazione del metanolo, nei mangimi contenenti sequestranti, è risultata quindi significativamente più bassa ($p<0,001$) rispetto a quella dell'acetone. Inoltre, è risultato un effetto dose-dipendente ($p<0,01$): i livelli di AFB_1 si sono rivelati più bassi, quando la dose del sequestrante aggiunto ai mangimi è stata più elevata (2%).

Tabella 1. Contenuto medio di AFB_1 (μg/kg), nei mangimi a maggiore contaminazione, contenenti sequestranti all'1 e 2%, usando le miscele estraenti acetone:H_2O (85:15 v/v) e metanolo:H_2O (80:20 v/v)

Sequestrante	Dose			
	1%		2%	
	acetone:H_2O	metanolo:H_2O	acetone:H_2O	metanolo:H_2O
Sodio bentonite	11,72 ± 1,75	0,84 ± 0,11	9,74 ± 1,13	0,54 ± 0,11
Calcio bentonite	12,56 ± 0,12	1,65 ± 0,05	11,50 ± 1,13	0,95 ± 0,52
Zeolite	11,96 ± 1,43	2,86 ± 0,12	12,59 ± 1,07	2,79 ± 0,29
Caolinite	12,83 ± 0,53	3,14 ± 0,13	12,54 ± 037	3,59 ± 1,18
Parete di cellule di lieviti	12,21 ± 1,90	2,71 ± 0,02	10,70 ± 1,00	2,86 ± 0,21
Carbone attivo	7,99 ± 1,01	1,36 ± 0,03	5,73 ± 0,16	1,03 ± 0,02
Atox	13,16 ± 2,56	1,34 ± 0,26	12,43 ± 1,87	0,64 ± 0,27
Myco AD AZ	12,58 ± 1,75	4,22 ± 0,18	11,63 ± 1,99	0,55 ± 0,04
NovasilTM plus	11,53 ± 1,66	1,05 ± 0,15	13,59 ± 1,94	0,84 ± 0,13

Tabella 2. Contenuto medio di AFB_1 (μg/kg), nei mangimi a minore contaminazione, contenenti sequestranti all'1 e 2%, usando le miscele estraenti acetone:H_2O (85:15 v/v) e metanolo:H_2O (80:20 v/v)

Sequestrante	Dose			
	1%		2%	
	acetone:H_2O	metanolo:H_2O	acetone:H_2O	metanolo:H_2O
Sodio bentonite	5,42 ± 0,46	0,53 ±,0,02	5,60 ± 1,04	0,45 ± 0,03
Calcio bentonite	7,58 ± 0,63	1,94 ± 0,31	7,15 ± 0,55	1,37 ± 0,06
Zeolite	7,56 ± 0,64	2,43 ± 0,32	6,72 ± 0,34	2,48 ± 0,11
Caolinite	6,50 ± 0,73	2,27 ± 0,09	6,27 ± 0,30	2,07 ± 0,09
Parete di cellule di lieviti	6,81 ± 0,13	2,26 ± 0,20	6,49 ± 0,28	2,44 ± 0,11
Carbone attivo	4,17 ± 0,18	1,30 ± 0,10	2,98 ± 0,09	0,86 ± 0,17
Atox	7,25 ± 0,43	0,84 ± 0,02	7,25 ± 0,49	0,60 ± 0,06
Myco AD AZ	6,68 ± 0,53	4,91 ± 0,70	6,37 ± 0,12	2,85 ± 0,14
NovasilTM plus	7,41 ± 0,63	0,83 ± 0,04	5,58 ± 0,14	0,60 ± 0,08

Dal confronto tra i diversi sequestranti, si osserva come i mangimi addizionati con carbone, ed estratti con la miscela acetone:acqua (85:15 v/v), evidenziano percentuali di recupero significativamente inferiori: la percentuale di recupero è stata pari al 54% e al 38%, rispettivamente per i mangimi con aggiunta di sequestrante al 1% e al 2%. Successivamente, da campioni naturalmente contaminati, alcuni addizionati con uno dei sequestranti considerati (ATOX al 2%), è stata effettuata in quadruplo l'estrazione delle AF usando diverse miscele acetone:H_2O (Tabella 3). I risultati indicano che le miscele acetone:acqua nei rapporti 70:30 v/v e 60:40 v/v hanno una efficienza di estrazione riguardo all'AFB_1 leggermente superiore rispetto alla miscela 85:15 v/v usata nel metodo AOAC.

Tabella 3. Contenuto medio di AFB_1 (µg/kg) in alcuni prodotti, usando diverse miscele estraenti

Campione	Acetone:H_2O 85:15	Acetone:H_2O 70:30	Acetone:H_2O 60:40	Acetone:H_2O 50:50	Metanolo:H_2O 80:20
Mangime 1	145,8 ± 1,3	166,2 ± 5,7	164,8 ± 3,6	153,8 ± 3,9	124 ± 7,6
Mangime 1 + ATOX 2%	118,0 ± 3,2	129,0 ± 3,5	129,7 ± 4,7	121,6 ± 4,0	19,8 ± 0,9
Mais 1	21,3 ± 0,4	22,5 ± 0,5	24,5 ± 0,8	21,2 ± 0,8	18,5 ± 0,7
Mais 1 + ATOX 2%	21,5 ± 0,6	23,4 ± 0,5	23,0 ± 0,9	21,3 ± 1,2	1,6 ± 0,1
Mais 2	4,1 ± 0,1	4,7 ± 0,2	4,7 ± 0,1	4,2 ± 0,1	3,6 ± 0,1
Mais 3	2,4 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,2 ± 0,1

Conclusioni

Dai risultati ottenuti, risulta evidente, come il metodo che prevede l'utilizzo di metanolo, per estrarre l'AFB_1 in mangimi contenenti sequestranti, può dare risultati errati e portare a decisioni manageriali scorrette negli allevamenti.

Prove su campioni naturalmente contaminati, con e senza aggiunta di sequestranti, hanno dimostrato inoltre come le miscele acetone:acqua nei rapporti 70+30 e 60+40 v/v, risultino avere la più alta efficienza di estrazione.

Bibliografia

1. Stroka J, Petz M, Joerissen U, Anklam E. Investigations of various extractant for the analysis of aflatoxin B1 in different food and feed matrices. *Food Additives and Contaminants* 1999;16:331-8.
2. Aflatoxin B1 in cattle feed. In: Horwitz W (Ed.). *Official methods of analysis of the AOAC International, 2006*. 18th ed. vol I. Chapter 49. Maryland, USA: AOAC International; 2006. (Method 2003.02). p. 38

SVILUPPO E APPLICAZIONE DI UN NUOVO SISTEMA ELISA PER L'ANALISI DI SCREENING DELL'OCRATOSSINA A NEL CIOCCOLATO

Chiara Tarantino (a), Emanuela Iafrate (b), Erica Bastiani (a), Maria Giovanna Perrotta (a), Francesca Gombac (a), Valentina Pellis (a), Carlo Brera (b)
(a) Euroclone SpA, Life Science Division, Milano
(b) Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

L'Ocratossina A (OTA) è un metabolita secondario prodotto da funghi appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium.* L'OTA ha attività nefrotossica, teratogena, immunosoppressiva e cancerogena. Molti sono gli alimenti interessati dalla contaminazione da parte di questa micotossina (cereali, caffè, frutta secca, vino, spezie ecc.) tra cui anche il cacao (1). La Circolare del Ministero della Salute n. 6 del 28/11/2003 (2) ha fissato in Italia il limite massimo tollerabile a 0,5 µg/kg per l'Ocratossina A nel cioccolato.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di sviluppare e di fare una prima valutazione di un sistema ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) competitivo adatto allo screening dell'OTA nel cioccolato. Per poter determinare la presenza di OTA al limite imposto dalla legislazione italiana, il nuovo sistema ELISA è stato messo a punto a partire da un test già disponibile ("Ochratoxin A quantitative ELISA", Euroclone SpA, cod. EEM004096), modificando il design del saggio in modo da ottenere un aumento di capacità di rilevazione e di sensibilità. Negli ELISA è stata impiegata una fase solida ottenuta adsorbendo direttamente gli anticorpi specifici anti Ocratossina A ai pozzetti di una micropiastra.

Per la preparazione dei campioni è stata valutata una estrazione veloce in 0,1% Bicarbonato + Polietilenglicole 0,3% pH 7,7 in confronto ad una purificazione su colonna di immunoaffinita (IAC).

Materiali e metodi

Gli ELISA presentati sono basati sulla competizione tra l'OTA libera, contenuta nei campioni o negli standard e quella coniugata con l'enzima rivelatore (perossidasi); esse competono per il legame con il medesimo anticorpo specifico anti OTA, adsorbito alla fase solida (pozzetto di una micropiastra). Alla reazione di competizione segue una fase di lavaggio per allontanare i reagenti in eccesso. Il rilevamento del coniugato enzimatico legato alla fase solida viene effettuato in una seconda reazione con l'aggiunta di una soluzione cromogena. L'attività enzimatica produce una soluzione colorata la cui assorbanza (OD) viene letta tramite un lettore per micropiastre. Il valore di assorbanza è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'OTA nel campione. Il B/Bo rappresenta il rapporto in percentuale tra la media delle OD misurate e quella dello Standard Zero (*Total Binding*).

Configurazione saggio ELISA di riferimento

Di seguito sono elencate schematicamente le fasi operative:

- implementare 50 µL dello standard zero nei pozzetti del Total Binding (TB).
- implementare 50 µL di soluzioni standard di taratura e di campioni nei pozzetti preposti.
- aggiungere 150 µL di OTA coniugato enzimatico in ogni pozzetto.
- incubare 20 minuti a temperatura ambiente (20-25°C).
- eliminare il liquido dai pozzetti svuotandoli per inversione della piastra.
- lavare per 5 volte con la soluzione di lavaggio.
- aggiungere 200 µL di soluzione cromogena in ogni pozzetto.
- incubare 20 minuti a temperatura ambiente, lontano da luce diretta.
- aggiungere 50 µL/pozzetto di soluzione di arresto.
- leggere con un lettore da micropiastre equipaggiato di filtro a 450 nm.

Configurazione saggio ELISA nuovo

Di seguito sono elencate schematicamente le fasi operative:

- implementare 150 µL dello standard zero nei pozzetti del TB.
- implementare 150 µL di soluzioni standard di taratura e di campioni nei pozzetti preposti.
- incubare 30 minuti a temperatura ambiente.
- aggiungere 50 µL di OTA coniugato enzimatico in ogni pozzetto.
- incubare 15 minuti a temperatura ambiente (20-25°C).
- eliminare il liquido dai pozzetti svuotandoli per inversione della piastra.
- lavare per 5 volte con la soluzione di lavaggio.
- aggiungere 200 µL di soluzione cromogena in ogni pozzetto.
- incubare 30 minuti a temperatura ambiente, lontano da luce diretta.
- aggiungere 50 µL/pozzetto di soluzione di arresto.
- leggere con un lettore da micropiastre equipaggiato di filtro a 450 nm.

Trattamento del campione

La preparazione del campione differisce in base al contenuto di cacao:

- *Cioccolato con contenuto in cacao ≤ 35%*
  - estrarre 5 g di campione con 25 mL del tampone di estrazione (3): 0,1% $NaHCO_3$ + Polietilenglicole 0,3% (PEG) pH 7,7-7,8.
  - agitare in shaker per 30 minuti.
  - filtrare o centrifugare per 10 minuti a 10000 x g.
  - diluire 1:2 in PBS (KCl 0,2 g/L + KH_2PO_4 0,2 g/L + Na_2HPO_4 1,16 g/L + NaCl 8 g/L a pH 7,4).
  - utilizzare 150 µL/pozzetto del diluito in ELISA.
- *Cioccolato con contenuto in cacao > 35%*
  - estrarre 5 g di campione con 50 mL del tampone di estrazione (3): 0,1% $NaHCO_3$ + PEG 0,3% pH 7,7-7,8.
  - agitare in shaker per 30 minuti.
  - filtrare o centrifugare per 10 minuti a 10000 x g.
  - diluire 2 mL di estratto con 10 mL di acqua deionizzata.

- purificare su colonna di immunoaffinità IAC E-Sycol-OTA, EUROCLONE equipaggiata di pre-colonna, secondo le istruzioni d'uso.
- eluire con 2 mL di metanolo.
- evaporare l'estratto.
- risospendere il campione in 1 mL del seguente tampone: 1 parte di 0,1% $NaHCO_3$ + PEG 0,3% pH 7,7-7,8. + 1 parte di PBS.
- utilizzare 150 µL/pozzetto in ELISA.

Risultati e discussione

Una comparazione tra le curve standard di riferimento viene riportata in Figura 1.
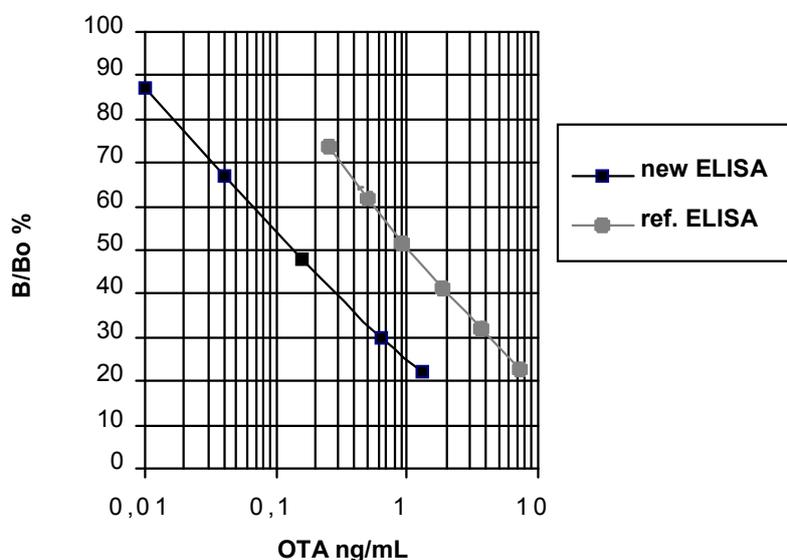
Figura 1. Comparazione fra le curve standard di riferimento del ref. ELISA rispetto al *new* ELISA (*high sensitive*)

Come si vede dalla Figura 1, modificando il design del saggio si ottiene un netto miglioramento della capacità di rilevazione del sistema. Successivamente, sono state effettuate prove di ripetibilità tramite l'analisi di 10 replicati di uno stesso campione di cioccolato a cui sono stati aggiunti due diversi livelli di contaminazione artificiale (*spike*) pari a 0,5 ed 1 µg/kg.

In Tabella 1 vengono riportati i dati preliminari di ripetibilità ottenuti. Dall'analisi dei CV% delle medie dei B/Bo% riportati, si nota che la ripetibilità ottenuta è buona. Si è inoltre osservata una variazione tra la media dei B/Bo% delle repliche del campione analizzato tal quale, rispetto alla media dei B/Bo% dello stesso campione addizionato di OTA a due livelli diversi di contaminazione; tale variazione rende idoneo il sistema a candidarsi come strumento valido per un'analisi di screening.

Tabella 1. Risultati dell'analisi di un campione di cioccolato con contenuto di cacao ≤35%, suddiviso in 10 aliquote che vengono testate e addizionate a 2 diversi livelli di OTA (0,5 µg/kg ed 1,0 µg/kg)

Campione	B/Bo %	Campione + 0,5 µg/kg	B/Bo%	Campione + 1,0 µg/kg	B/Bo %
1	52,8	1+0,5	44,8	1+1,0	34,7
2	58,1	2+0,5	39,7	2+1,0	36,7
3	51,9	3+0,5	38,5	3+1,0	38,2
4	52,7	4+0,5	41,6	4+1,0	33,5
5	47,4	5+0,5	41,2	5+1,0	33,0
6	49,9	6+0,5	40,4	6+1,0	32,9
7	49,3	7+0,5	42,0	7+1,0	37,0
8	50,8	8+0,5	38,9	8+1,0	36,0
9	50,4	9+0,5	42,4	9+1,0	34,1
10	52,0	10+0,5	39,4	10+1,0	33,6
Media	51,5	Media	40,9	Media	35,0
DS	2,9	DS	1,9	DS	1,8
CV %	5,6	CV %	4,7	CV %	5,3

DS: deviazione standard. CV: coefficiente di variazione

In Tabella 2, vengono riportati i dati preliminari ottenuti dall'analisi di alcuni campioni. I dati preliminari raccolti durante le prove eseguite su campioni provenienti dal circuito commerciale, dimostrano una discreta variazione tra i valori di B/Bo% delle varie tipologie di campioni e dei rispettivi addizionati, confermando le potenzialità di applicabilità del nuovo sistema ELISA ad una analisi di screening; attitudine già dimostrata dal sistema durante le prime prove di ripetibilità.

Tabella 2. Analisi preliminare di alcuni campioni a contenuti variabili di cacao addizionati a diversi livelli di OTA (0,5 µg/kg 1,0 µg/kg e 2,0 µg/kg)

Campione (% di cacao)	OD1*	OD2*	MEDIA	DS	CV %	B/B0 %
Camp. G (30%)	1230	1272	1251	29	2,4	79,7
Camp. G + 0,5 µg/kg	1011	959	985	36	3,7	62,1
Camp. G + 1,0 µg/kg	902	852	877	35	4,0	55,0
Camp. G + 2,0 µg/kg	681	661	671	14	2,1	41,3
Camp. N (30%)	1181	1168	1175	9	0,8	74,6
Camp. N + 0,5 µg/kg	928	958	943	21	2,2	59,3
Camp. N + 1,0 µg/kg	839	811	825	19	2,4	51,5
Camp. N + 2,0 µg/kg	626	618	622	5	0,9	38,1
Camp. L (30%)	993	1013	1003	14	1,4	63,3
Camp. L + 0,5 µg/kg	922	924	923	1	0,2	58,0
Camp. L + 1,0 µg/kg	814	802	808	8	1,1	50,4
Camp. L + 2,0 µg/kg	726	587	657	98	15,0	40,4
Camp. Z (50%)	835	887	865	27	3,1	82,0
Camp. Z + 0,5 µg/kg	655	689	672	24	3,6	63,0
Camp. Z + 1,0 µg/kg	561	591	578	15	2,7	53,0
Camp. R (71%)	923	896	910	19	2,1	87,0
Camp. R + 0,5 µg/kg	774	810	792	25	3,2	75,0
Camp. R + 1,0 µg/kg	634	642	638	5	0,9	59,0

(*) I valori di OD sono moltiplicati per 1000

Conclusioni

Come si può vedere dalla Figura 1, il nuovo test ha una curva con una capacità di rilevazione maggiore rispetto al vecchio sistema (0,010-1,28 ng/mL) e dimostra una buona ripetibilità (vedi Tabella 1). Per quanto riguarda l'analisi di campioni di cioccolato, già in sede di progettazione dello studio è emersa subito una criticità a carico della tipologia di campioni su cui eseguire l'analisi, essendo la matrice molto complessa e variabile rispetto al contenuto percentuale di cacao. L'effetto matrice espresso in termini di concentrazione di analita apparente è ancora troppo elevato per permettere delle quantificazioni accurate di recupero sui campioni addizionati (*spike*). Ciononostante ragionando in termini di variazione di B/Bo% tra i campioni negativi e quelli addizionati, la differenza riscontrata è tale da poter candidare il sistema come uno strumento utile in una analisi di screening. Comunque i dati preliminari ottenuti, suggeriscono che una procedura rapida di preparazione del campione può essere applicata con successo solo a cioccolati con contenuto di cacao ≤ 35%. Per campioni con contenuto di cacao > 35% è invece richiesta una purificazione su IAC in modo da renderli idonei all'analisi in ELISA. Il test si presta inoltre a trovare applicazione in altre matrici alimentari laddove si richieda di determinare la presenza di OTA A a basse concentrazioni.

Bibliografia

1. Serra Bonvehì J. Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and choccolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004;52(20):6347-52.
2. Italia. Circolare del 28 novembre 2003, n. 6. Valori massimi ammissibili di Ocratossina A nel cacao. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 286, 10 dicembre 2003.
3. Brera C, Grossi S, De Santis B, Miraglia M. High Performance Liquid Chromatographic method for the determination of Ochratoxin A in cocoa powder. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 2003;26(4):585-98.

PRECOCE RILEVAMENTO DI *PENICILLIUM EXP*ANSUM, PRODUTTORE DI PATULINA, SU POMACEE MEDIANTE PCR *REAL TIME*

Valentina Tolaini (a), Patrizia De Rossi (b), Antonella Del Fiore (b), Massimo Reverberi (a), Anna Adele Fabbri (a), Corrado Fanelli (a)
(a) Dipartimento di Biologia Vegetale, Università degli Studi "Sapienza", Roma
(b) Dipartimento di Biotecnologie, Agroindustria e Protezione della Salute, Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile (ENEA), Centro Ricerche Casaccia, Roma

Introduzione

Penicillium expansum è l'agente eziologico del marciume verde-azzurro delle pomacee in post-raccolta e la sua infezione è associata con la produzione di Patulina, una micotossina con effetti tossici a livello immunologico, neurologico e gastrointestinale in modelli animali (1). L'utilizzo di frutti colpiti da tale patogeno anche nelle fasi iniziali di infezione incrementa il rischio di contaminazione da Patulina in succhi di frutta e altri prodotti di trasformazione, consumati principalmente da bambini. Per assicurare la qualità e la salubrità di frutti e succhi è quindi fondamentale disporre di un rapido e specifico metodo di rilevamento di tale patogeno, che consenta di accertarne tempestivamente la presenza e di adottare le opportune misure di sanificazione.

L'obiettivo di tale lavoro è stato quello di sviluppare e ottimizzare un saggio basato su *Polymerase Chain Reaction Real Time* (PCR *Real Time*), metodica maggiormente sensibile rispetto alla PCR classica, per il precoce rilevamento di *Penicillium expansum* su mele.

Materiali e metodi

Inoculo di *Penicillium expansum* su mele

Mediante carotatore sterile sono state fatte quattro ferite (ø 6 mm x 3 mm) nella zona circostante il picciolo di mele (cv *Golden delicious*) precedentemente sterilizzate, e sono state inoculate con 15 µL di una sospensione acquosa contenente 5-10 conidi di *P. expansum*. Le ferite non inoculate hanno costituito il controllo. Le mele sono state incubate a 25°C e 90% di umidità relativa per 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 ore.

Estrazione del DNA

Le ferite di mela, recuperate tramite carotatore sterile, sono state liofilizzate e sottoposte ad estrazione del DNA utilizzando il metodo TRIS-SDS *Lysis Buffer* (2) con alcune modifiche.

È stato inoltre estratto il DNA direttamente da mele acquistate in diversi punti vendita, provenienti sia da agricoltura biologica che convenzionale, integre e prive di alcun segno di marciume.

Polymerase Chain Reaction Real Time

Una coppia di *primer* specie-specifici è stata disegnata sulla sequenza conservata del gene della poligalatturonasi Pepg1, enzima coinvolto nella formazione del marciume molle nei tessuti vegetali (3). Tali *primer* ((PG1F 5' – TTG ACA CGC AGT GTT GTT CTG GGA – 3'; PG1R 5' – TGC ACC ACT GGT TCC CGA ATA GC – 3') amplificano un frammento di 135 bp. Diluizioni note di DNA plasmidico (0,0015 pg÷150 ng) contenente il frammento d'interesse sono state prelinarmente amplificate e quantizzate per ottenere la curva di taratura (R^2=0,9944) per mettere in relazione il segnale di fluorescenza al quantitativo di DNA nei campioni.

Condizioni ottimali di amplificazione: 94°C per 1 min, 94°C per 15 s, 57,4°C per 20 s, 72°C per 15 s (*steps* da 2 a 4 ripetuti per 32 cicli), 72°C per 8 min.

Risultati e discussioni

Le condizioni di PCR *Real Time* messe a punto hanno mostrato un'elevata sensibilità dei *primer* utilizzati, permettendo di amplificare fino a 0,0015 pg di DNA fungino.

La tecnica ha consentito di rilevare e quantizzare il DNA fungino estratto da matrice inoculata artificialmente con 5-10 conidi dopo solo 6 ore dall'inoculo (Figura 1).
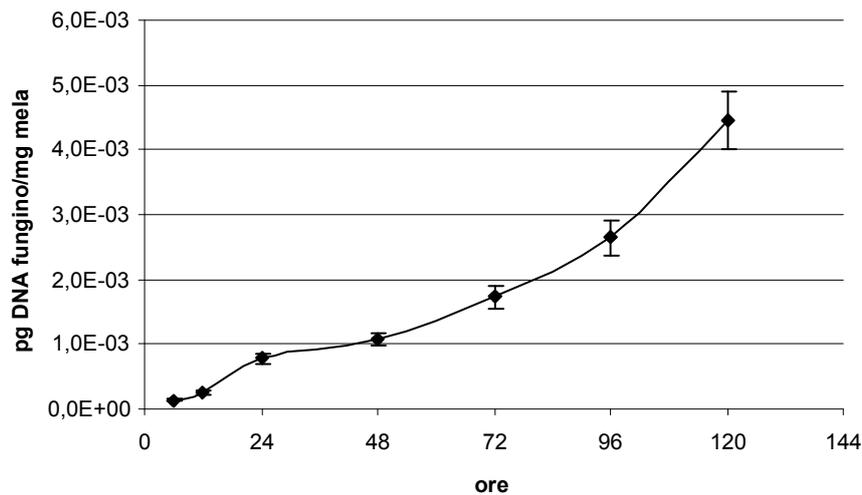
Figura 1. Quantitativo di DNA estratto da mela inoculata con 5-10 conidi a differenti tempi di analisi. I valori rappresentano la media di tre repliche per tesi ± ES

Inoltre, i *primer* hanno permesso di rilevare *P. expansum* su mele commerciali, sia biologiche che convenzionali, in quantità bassissime (Figura 2), rappresentanti comunque un inoculo sufficiente a far sviluppare il patogeno dopo 10 giorni di incubazione delle stesse mele a 25°C.
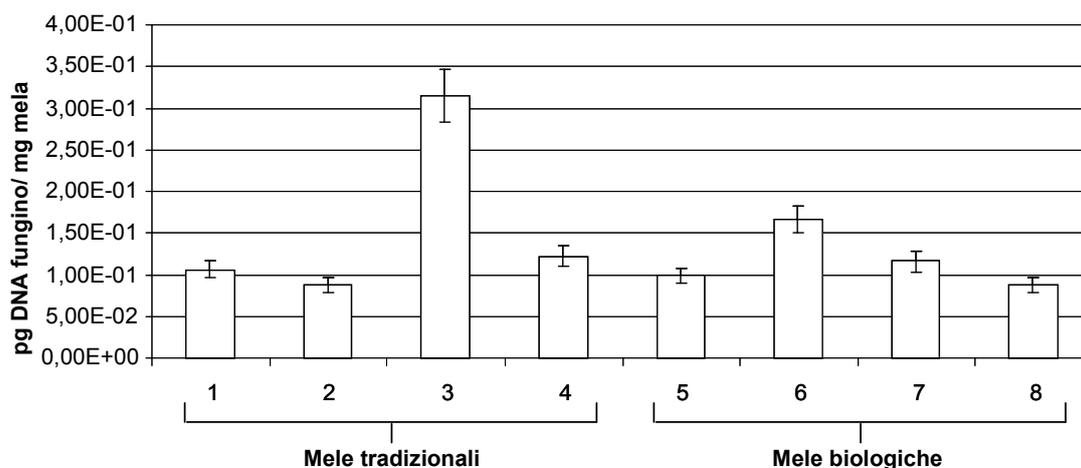
Figura 2. Quantità di DNA fungino rilevato in mele commerciali mediante RT-PCR (i valori rappresentano la media di tre repliche per tesi ± ES)

La mancata amplificazione del DNA di mela ha confermato la specificità dei *primer* per *P. expansum* (dati non mostrati).

I risultati ottenuti in tale lavoro hanno confermato la diffusa e comune presenza di *P. expansum* su mele ed hanno evidenziato l'elevata sensibilità dei *primer* PG1 e della PCR *Real Time,* metodica che potrebbe essere facilmente applicata per *l'early detection* del fungo su scala commerciale in quanto applicabile al DNA estratto direttamente da tessuto vegetale, senza necessità di isolare precedentemente la microflora, identificarla e sottoporre ad estrazione il micelio fungino.

Bibliografia

1. Pitt JI. Toxigenic *Penicillium* species. In: Doyle MP, Beuchat LB, Montville TJ. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington (DC): ASM Press; 1997. p. 406-18.
2. Marek P, Annamalai T, Venkitanarayanan K. Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction. *Inernational Journal of Food Microbiology* 2003;89:139-44.
3. Yao C, Conway WS, Ren R, Sams CE. 1998. Cloning and analysis of a gene encoding polygalacturonase in *Penicillium expansum*. Direct Submission Genbank, accession AF047713.

DETERMINAZIONE SIMULTANEA DI AFLATOSSINE, OCRATOSSINA A E TOSSINE DI *FUSARIUM* IN CEREALI MEDIANTE PURIFICAZIONE SU COLONNINE A IMMUNOAFFINITÀ MULTIANTICORPO E LC-MS/MS

Veronica M.T. Lattanzio (a), Michele Solfrizzo (a), Stefania Della Gatta (a), Stephen P. Powers (b), Angelo Visconti (a)
(a) Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA), Centro Nazionale Ricerche, Bari
(b) Vicam Group of Waters Technology Corp,Watertown, USA

Introduzione

Il sistema di allarme rapido europeo (*Rapid Alert System for Food and Feed*, RASFF) vede le micotossine al primo posto tra i diversi contaminanti per numero di notifiche di superamento dei limiti massimi consentiti nelle derrate alimentari all'importazione. Tra le diverse categorie di prodotti monitorate, quella dei cereali e prodotti a base di cereali merita una particolare attenzione per la suscettibilità alla contaminazione simultanea di diverse micotossine (1). La Commissione Europea ha pertanto stabilito i livelli massimi ammissibili in cereali e prodotti derivati per tutte le principali micotossine ovvero Aflatossine, Ocratossina A, Fumonisine, Zearalenone e Deossinivalenolo (2,3), mentre i limiti per le Tossine T-2 e HT-2 sono attualmente in discussione e saranno emanati a breve.

Per assicurare il rispetto della legislazione e per proteggere il consumatore, lo sviluppo di metodiche analitiche sensibili, robuste ed affidabili per la determinazione di micotossine nelle varie matrici agroalimentari è in continua evoluzione (4). Negli ultimi decenni la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC, *High-Performance Liquid Chromatography*) è diventata la tecnica più ampiamente utilizzata per l'analisi delle micotossine sottoposte a regolamentazione in alimenti e mangimi. In questo contesto, l'utilizzo dello spettrometro di massa come rivelatore HPLC ne aumenta ulteriormente le potenzialità, offrendo la possibilità di ottenere determinazione quantitativa e conferma univoca in un'unica analisi. La diffusione di questa tecnica ha aperto inoltre la strada allo sviluppo di metodiche multi-residuali per la determinazione simultanea di micotossine appartenenti a diverse famiglie. Tuttavia, le recenti pubblicazioni in merito mettono in evidenza come queste metodiche non siano facili da sviluppare proprio in ragione delle diverse proprietà chimico-fisiche delle varie micotossine, che devono essere attentamente gestite in tutte le fasi della procedura analitica (5, 6). La fase più critica è rappresentata dalla ottimizzazione delle condizioni di estrazione, che deve garantire recuperi accettabili per tutti gli analiti in esame. In particolare, la principale difficoltà è costituita dalla coestrazione delle Fumonisine insieme alle altre micotossine. Per questo motivo, la maggior parte dei metodi multi-residuali ad oggi pubblicati non include le fumonisine o riporta recuperi non accettabili per queste tossine (7-9). Per la purificazione degli estratti sono state testate differenti colonnine per estrazione in fase solida con differenti livelli di successo (8, 10). Alcuni autori optano invece per l'analisi degli estratti mediante iniezione diretta (7, 9). Tuttavia, omettere completamente la purificazione del campione si traduce generalmente in un consistente effetto matrice sulla ionizzazione degli analiti, che si ripercuote negativamente sulla sensibilità e sulla robustezza del metodo. Tali metodiche pertanto sono da considerarsi metodiche di screening.

Presso i laboratori dell'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA)-CNR di Bari è stato recentemente sviluppato un metodo accurato e riproducibile per l'analisi simultanea di Aflatossine (AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2), Ocratossina A (OTA), Fumonisine (FB_1, FB_2), Tricoteceni (Deossinivalenolo DON, Tossina T-2, Tossina HT-2) e Zearalenone (ZEA) in mais (11). Il presente lavoro descrive l'estensione del metodo a frumento e orzo. Sono inoltre discussi i risultati di uno studio dettagliato dell'effetto matrice per tutte le undici tossine nei cereali in oggetto.

Risultati e discussione

Per ottenere una elevata efficienza di estrazione per tutte le 11 micotossine, aventi differente polarità e struttura chimica, è stato sviluppato un nuovo approccio basato su una doppia estrazione con tampone fosfato a pH 7,4 e una miscela metanolo/tampone fosfato (70:30, v/v). Per la purificazione degli estratti sono state utilizzate nuove colonnine ad immunoaffinità (Myco6in1™, VICAM) contenti 6 diversi anticorpi per Aflatossine, Ocratossina A, Fumonisine, Deossinivalenolo, Tossine T-2 e HT-2 e Zearalenone. La separazione e rivelazione di queste micotossine sono state stata effettuate mediante cromatografia liquida-spettrometria di massa/massa (LC-ESI-MS/MS *Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry*). Per l'analisi cromatografica è stata utilizzata una colonna Gemini® C18 (150 mm × 2 mm, 5 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA), con una fase mobile binaria composta da metanolo e acqua contenenti acetato di ammonio 1 mM e acido acetico 0,5%. Per la rivelazione è stato usato uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo (QTrap® MS/MS system, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) operante in modalità MRM (Multiple Reaction Monitoring).

In Figura 1 è riportato un cromatogramma di un estratto di mais fortificato con le 11 micotossine considerate in questo studio.
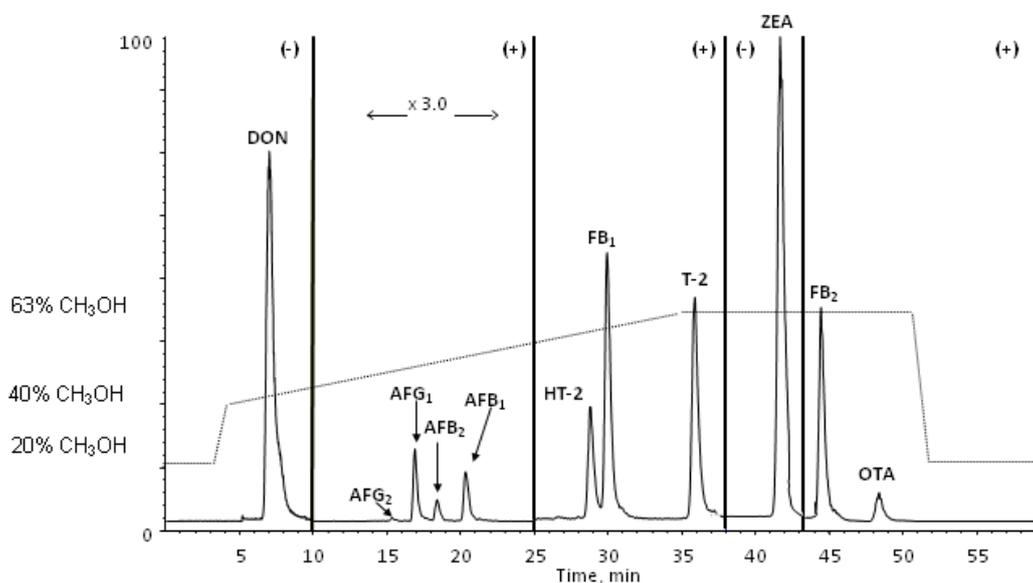
Figura 1. Cromatogramma (TIC) di un estratto di mais artificialmente contaminato con: 500 µg/kg DON; 2 µg/kg AFG_2, AFB_2; 6 µg/kg AFG_1; 10 µg/kg AFB_1; 500 µg/kg FB_1; 250 µg/kg FB_2; 100 µg/kg HT-2, T-2, ZEA; 20 µg/kg OTA
(le linee verticali indicano i periodi di inversione della polarità della sorgente ESI, la linea tratteggiata illustra i cambiamenti nella composizione della fase mobile)

Le caratteristiche del metodo in termini di recuperi, ripetibilità e linearità sono state valutate in mais, frumento e orzo, a livelli di contaminazione intorno ai limiti di legge per ogni micotossina considerata. Le percentuali di recupero (valutate a tre livelli di contaminazione) variano da 64 a 103% in mais, da 60 a 91% in frumento e da 64 a 103% in orzo, con deviazioni standard relative (n. =3) inferiori al 13%. I limiti di rivelabilità (LOD, *Limit of Detection*) (calcolati ad un rapporto segnale/rumore pari a 3) sono compresi tra 0,1 a 5,8 µg/kg in mais, 0,2 e 5,1 µg/kg in frumento e 0,1 e 2,4 µg/kg in orzo. I valori di recupero e di ripetibilità del metodo sono conformi ai criteri stabiliti dal CEN (European Committee for Standardization) e riportati nel Reg. CE 401/2006 (12) per l'accettazione di metodi analitici per la determinazione delle varie micotossine in esame. In Figura 2 sono infine riportati due esempi di cromatogrammi ottenuti dall'analisi di campioni di mais (A) e frumento (B) naturalmente contaminati.
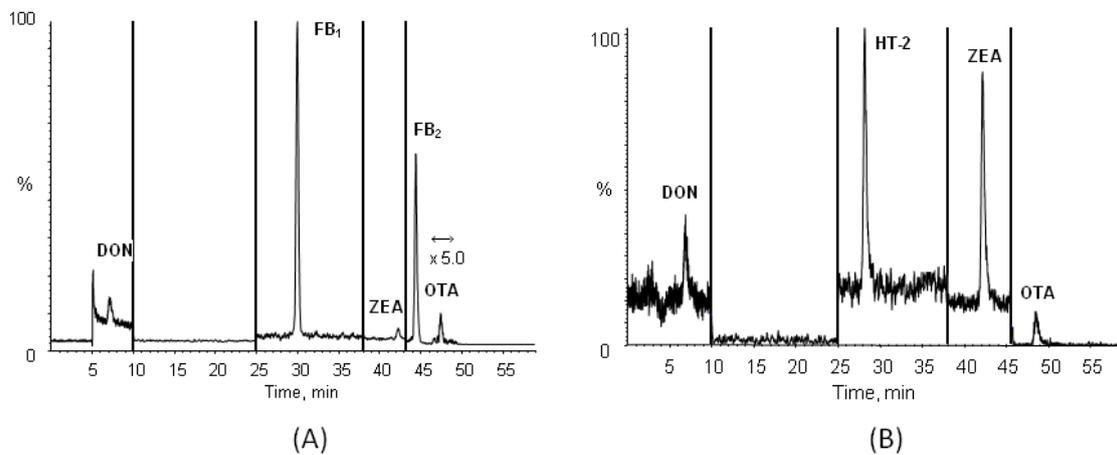
Figura 2. Cromatogrammi (TIC) di un estratto di mais naturalmente contaminato da 5 µg/kg DON, 72 µg/kg FB_1, 16 µg/kg FB_2, 0,5 µg/kg ZEA e 0,3 µg/kg OTA (A) e un estratto di frumento naturalmente contaminato da 2,4 µg/kg DON, 55,2 µg/kg HT-2, 7,4 µg/kg ZEA e 1,6 µg/kg OTA (B)

Nell'ambito di questo lavoro, è stato inoltre valutato l'effetto matrice sulla ionizzazione degli analiti con un test statistico (*Student t test*) che determina la significatività della differenza di pendenza tra le rette di calibrazione ottenute con soluzioni standard preparate in fase mobile e in estratti di cereali purificati su colonnina ad immunoaffinità. I risultati di questo studio hanno mostrato un effetto matrice statisticamente significativo in soli 4 casi su 29, ovvero per Aflatossine e Ocratossina A in estratti di mais e Zearalenone in estratti di orzo. In tutti gli altri casi invece l'effetto matrice era trascurabile. La calibrazione in matrice rimane pertanto necessaria per un'analisi quantitativa accurata. Considerando i limiti di rivelabilità sopra riportati si evince come la purificazione e la concentrazione del campione mediante colonnine ad immunoaffinità consenta di ottenere una elevata sensibilità (LOD intorno a 1 µg/kg) anche utilizzando spettrometri di massa non di ultima generazione. Non trascurabili sono inoltre i vantaggi derivanti dall'iniezione di campioni molto puliti in termini di tempo di vita della colonna cromatografica e pulizia dell'interfaccia dello spettrometro di massa, che si traducono in una maggiore robustezza dell'intera procedura analitica.

Conclusioni

La metodica analitica proposta è stata applicata con successo per la determinazione simultanea di Aflatossine, Ocratossina A e *Fusarium* tossine in mais, frumento e orzo. L'approccio sperimentale sviluppato, basato su una doppia estrazione con tampone fosfato e metanolo/acqua (70:30) e purificazione degli estratti mediante colonnine a immunoaffinità multi-anticorpo, consente la co-estrazione di tutte le 11 micotossine considerate con recuperi accettabili. Le caratteristiche del metodo in termini di recuperi e ripetibilità sono conformi ai criteri stabiliti dal Reg. CE 401/2006 (12). Il metodo risulta inoltre sufficientemente sensibile per essere applicato all'analisi di cereali naturalmente contaminati e verificare in una singola analisi la conformità con i limiti massimi ammissibili stabiliti dalla legislazione vigente (2, 3) per Aflatossine, Ocratossina A, Deossinivalenolo, Zearalenone e Fumonisine.

Bibliografia

1. RASFF. *The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual report 2008*. Luxembourg: European Communities; 2009. Disponibile all'indirizzo: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/ report2008_en.pdf; ultima consultazione 7/10/2009.
2. Unione Europea. Regolamento CE n. 1881 del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *GUCE* L. 364/5, 20 dicembre 2006.
3. Unione Europea. Regolamento CE n. 1126/2007 della Commissione del 28 settembre 2007 che modifica il reg. CE n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le Fusarium-tossine nel granoturco e nei prodotti a base di granoturco. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 255, del settembre 2007.
4. Shephard GS, Berthiller F, Dorner J, Krska R, Lombaert GA, Malone B, Maragos C, Sabino M, Solfrizzo M, Trucksess MW, van Egmond HP, Whitaker TB. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2007-2008. *World Mycotoxin Journal* 2009;2:3-21.
5. Zöllner P, Mayer-Helm B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2006;1136:123-69.
6. Songsermsakul P, Razzazi-Fazeli E. A review of recent trends in applications of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of mycotoxins. *The Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2008;31:1641-86.
7. Sulyok M, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. Rapid *Communications in* Mass Spectrometry 2006;20:2649-2659.
8. Ren Y, Zhang Y, Shao S, Cai Z, Feng L, Pan H, Wang Z. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal* of *Chromatography* A 2007;1143:48-64.
9. Spanjer MC, Rensen PM, Sholten JM. LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanuts, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Additives & Contaminan*ts 2008;25(4):472-489.
10. Sørensen LK, Elbæk TH. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2005;820:183-96.
11. Lattanzio VMT, Solfrizzo M, Powers S, Visconti A. Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium toxins by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity clean up. *Rapid Communications* in *Mass Spectrometry* 2007;21:3253-61.

12. Unione Europea. Regolamento CE n. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006. Metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *GUCE* L 70, 9 marzo 2006.